

BIOKIMIA KLINIK



RISNA AGUSTINA, M.SI, APT

MODUL PEMBELAJARAN BIOKIMIA KLINIK

Penyunting : Dr. Rolan Rusli, S.Pd., M.Si.

Penyusun : Risna Agustina, M.Si., Apt

Editor : Wisnu Cahyo Prabowo, M.Si., Apt

KATA PENGANTAR

Modul pembelajaran ini disusun agar para mahasiswa dapat lebih memahami maksud serta cara-cara pembelajaran praktik yang akan dilakukan, maka setiap mahasiswa sebelum acara praktikum dimulai, harus mengikuti kuliah pengantar praktikum dengan baik yaitu mata kuliah Biokimia Klinik. Praktikum Biokimia Klinik di Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, diberikan dalam 1 mata kuliah dalam satu semester.

Pembelajaran Biokimia Klinik dimaksudkan dapat memberikan mahasiswa suatu keterampilan tentang dasar-dasar yang diperlukan untuk bekerja dalam bidang Biokimia klinik antara lain :analisis Kolesterol Total, analisis trigliserida, analisis protein total, analisis albumin, analisis albumin, analisis kalsium, serta mengukur kadar unsur –unsur dalam darah dan urine menggunakan spektrofotometer.

Pembelajaran ini diharapkan dapat menjadi modal dasar untuk melakukan persiapan penelitian analisis klinik bagi mahasiswa yang memiliki keinginan penelitian dalam bidang biokimia umumnya dan analisis klinik khususnya.

Samarinda, Januari 2021

Penyusun

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	4
DAFTAR ISI.....	5
MATERI I.....	6
PENENTUAN KADAR KOLESTEROL TOTAL (KUANTITATIF)	
MATERI II.....	13
PENENTUAN KADAR TRIGLISERIDA (KUANTITATIF)	
MATERI III	20
PENENTUAN KADAR PROTEIN TOTAL (KUANTITATIF)	
MATERI IV	27
PENENTUAN KADAR ALBUMIN (KUANTITATIF)	
MATERI V	34
PENENTUAN KADAR ASAM URAT (KUANTITATIF)	
MATERI VI	41
PENENTUAN KADAR KALSIMUM (KUANTITATIF)	

MATERI I
PENENTUAN KADAR KOLESTEROL TOTAL
(KUANTITATIF)

Tujuan Pembelajaran :

- a. Mengetahui penanganan awal sampel biologis pada penetapan kadar kolesterol total
- b. Mengetahui metode dan cara penentuan kadar kolesterol total secara kuantitatif

Pendahuluan

A. Dasar Teori

Kolesterol adalah lemak berwarna kekuningan dan berupa seperti lilin yang diproduksi oleh tubuh manusia terutama di dalam hati. (Lars H, 1997). Kolesterol merupakan lemak yang penting namun jika terlalu berlebihan dalam darah dapat membahayakan kesehatan, bila ditinjau dari sudut kimiawi kolesterol diklasifikasikan ke dalam golongan lipid (lemak) berkomponen alkohol steroid (Sitopoe M, 1992). Kolesterol termasuk zat gizi yang sukar diserap oleh tubuh, masuk ke dalam organ tubuh melalui sistem limpatik. Kolesterol dalam plasma darah terutama dijumpai berikatan dengan asam lemak dan ikut bersirkulasi dari bentuk ester kolesterol (Hertog N, 1992).

Sumber kolesterol berasal dari semua bahan makanan asal hewani, daging, telur, susu, dan hasil perikanan, jaringan otak, jaringan saraf, dan kuning telur. Kolesterol dalam tubuh juga mempunyai fungsi yang penting diantaranya: pembentukan hormon testosteron pada pria dan hormon estrogen pada wanita, pembentukan vitamin D, dan sebagai sumber energi.

Kolesterol dibentuk melalui asetat yang diproduksi dari nutrien dan energi serta hasil metabolisme lainnya disamping kolesterol juga memproduksi energi. Sumber energi berlebihan mengakibatkan pembentukan asetat sebagai perantara juga berlebih, dan lemak di dalam tubuh juga akan bertambah. Pembentukan kolesterol melalui asetat merupakan proses yang sangat kompleks, diantaranya yang memegang peranan penting adalah enzim reduktase HMG – Co.A. Pembatasan konsumsi kolesterol akan berakibat meningkatnya kadar kolesterol dalam darah apabila sistem kerja enzim tidak normal. Kolesterol pada keadaan normal disintesa dalam makanan yang dimakan, diubah menjadi jaringan, hormon-hormon vitamin yang kemudian beredar ke dalam tubuh melalui darah, namun ada juga kolesterol kembali ke dalam hati untuk diubah menjadi asam empedu dan garamnya, hasil sintesa kolesterol disimpan dalam jaringan tubuh.

Lipoprotein adalah gabungan molekul lipid dan protein yang disintesis di dalam hati. Tiap jenis lipoprotein berbeda dalam ukuran, disintesa dan mengangkut berbagai jenis lipid dalam jumlah yang berbeda (Sunita A, 2002). Jenis lipoprotein yang dapat memicu terjadinya atherosclerosis yang terdiri dari total kolesterol, LDL, HDL, dan trigliserida. Partikel-partikel ini memiliki sifat khusus dan berbeda pada proses pembentukan atherosclerosis, sebagai berikut:

- a) LDL (low density lipoprotein), yang paling banyak mengangkut kolesterol di dalam darah.
- b) HDL (high density lipoprotein), mengangkut kolesterol lebih sedikit. Memiliki fungsi yaitu membuang kelebihan LDL kolesterol di pembuluh arteri kembali ke liver untuk diproses dan dibuang.
- c) VLDL (very low density lipoprotein), memiliki jumlah trigliserida yang terbanyak dalam darah. Sebagian VLDL diubah menjadi LDL.
- d) Trigliserida, yaitu jenis lemak dalam darah yang dapat mempengaruhi kadar kolesterol dalam darah. Kelebihan trigliserida akan dihidrolisa oleh enzim lipoprotein lipase, sisa hidrolisa kemudian oleh hati dimetabolisasikan menjadi LDL kolesterol

Keseimbangan lipid dalam darah diatur oleh beberapa mekanisme yaitu meningkatkan atau menurunkan kecepatan pengeluaran lipoprotein dalam darah dan mengurangi pembentukan lipoprotein serta jumlahnya yang masuk dalam darah. Kolesterol LDL meningkatkan risiko serangan jantung karena LDL dapat menembus dinding pembuluh darah dan menghambat aliran darah pada arteri koronaria yang mendarahi jantung. Kolesterol yang dibawa oleh HDL akan menurunkan resiko serangan jantung karena kolesterol ini membawa sisa kolesterol menuju hepar untuk dimetabolisme.

Kadar lipid serum normal menurut NCEP ATP III 2001 (mg/dL)

Profil lipid	Nilai	Kategori
Kolesterol total	<200	Optimal
	200-239	Diinginkan
	≥240	Tinggi
Kolesterol LDL	<100	Optimal
	100-129	Mendekati optimal
	130-159	Diinginkan
	160-189	Tinggi
	≥190	Sangat tinggi

Kolesterol HDL	<40	Rendah
	≥60	Tinggi
Trigliserida	<150	Optimal
	150-199	Diinginkan
	200-499	Tinggi
	≥500	Sangat tinggi

A. Prinsip Dasar Penentuan Kadar Kolesterol Total

Prinsip dasar percobaan adalah penentuan kolesterol melalui hidrolisis enzimatis dan oksidasi. Indikator kolorimetri adalah indikator quinonimine yang dihasilkan dari 4-aminoantipirine dan fenol oleh hidrogen peroksida dibawah pengaruh katalis peroksidase (reaksi trinder).



Prosedur

Panjang gelombang : Hg 546 nm (500 nm)

Optical path : 1 cm

Suhu inkubasi : 20 – 25°C atau 37°

Bahan :

Sampel Darah 10-15 ml

Pereaksi :

1. Good buffer pH 6.7 : 50 mmol/L
2. Fenol : 5 mmol/L
3. 4-aminoantipirine : 0,3 mmol/L
4. Kolesterol esterase : ≥ 200 U/L
5. Kolesterol oksidase : ≥ 50 U/L
6. Peroksidase : ≥ 2kU/L
7. Standard : 200 mg/dL (5,2 mmol/L)

Spesimen (sampel biologis)

Serum, heparin plasma atau EDTA plasma

Stabilitas:

- 7 hari pada suhu 20-25°C,
- 7hari pada suhu 7-8°C dan

- 30 bulan pada suhu -20°C

Alat :

Tabung reaksi

EDTA

Sentrifuge

Kit

Spektrofotometer

Miropipet

Pelaksanaan :

Dipipetkdalamtabungreaksi :

Pipet ke dalam kuvet	Blank	Standar	Sampel
Reagen	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Sampel	-	10 µl	10 µl
aquabides	10 µl	-	-
Campur, inkubasi selama 10 menit disuhu disuhu 37°C. Ukur absorbansi standardansampel terhadap blanko reagen dalam waktu 60 menit. (ΔA)			

PerhitunganKonsentrasi

Serum/plasma

$$C = \frac{\Delta A_{\text{sampel}}}{\Delta A_{\text{standar}}} [\text{mg/dl}] \times \text{Conc. of Std (mg/dL)}$$

Faktor konversi Kolesterol

$$(\text{mg/dl}) \times 0.02586 = \text{Kolesterol (mmol/l)}$$

Hasil Pengamatan

No	Nama sampel	Asorbansi	Kadar (mg/dL)	Kadar (mmol/L)

Pertanyaan:

1. Jelaskan 4 golongan besar kolesterol?
2. Bagaimana proses pembentukan kolesterol di dalam tubuh?
3. Sebutkan metode-metode yang dapat digunakan untuk penentuan kadar kolesterol total?
4. Jelaskan metode yang Anda gunakan dalam percobaan ini!
5. Jelaskan hasil percobaan yang Anda dapatkan? Apakah nilai kolesterolnya normal atau tidak normal?
6. Jelaskan mengapa kadar kolesterol bisa tidak normal dalam tubuh?
7. Buatlah kesimpulan tentang percobaan ini!

LEMBAR PENILAIAN

TANGGAL PEMBELAJARAN :			
TANGGAL PENYERAHAN LAPORAN:			
NILAI KEHADIRAN		TOTAL NILAI	
NILAI RESPONSI			
NILAI AKTIVITAS			
NILAI HJSP			
CATATAN :			
TANDA TANGAN			
MAHASISWA	ASISTEN	DOSEN	

MATERI II
PENENTUAN KADAR TRIGLISERIDA
(KUANTITATIF)

Tujuan Pembelajaran :

- a. Mengetahui penanganan awal sampel biologis pada penetapan kadar trigliserida
- b. Mengetahui metode dan cara penentuan kadar trigliserida secara kuantitatif

Pendahuluan

A. Dasar Teori

Trigliserid merupakan lemak di dalam tubuh yang terdiri dari 3 jenis lemak yaitu lemak jenuh, lemak tidak jenuh tunggal dan lemak tidak jenuh ganda. Kadar trigliserid yang tinggi merupakan faktor risiko untuk terjadinya PJK

Trigliserida dalam darah ditransportasikan melalui dua jalur yaitu jalur eksogen dan jalur endogen. Pada jalur eksogen, trigliserida dalam usus dikemas dalam kilomikron. Trigliserida dalam kilomikron tadi akan mengalami penguraian lanjutan yang dilakukan oleh enzim lipoprotein lipase sehingga akhirnya terbentuk asam lemak bebas dan kilomikron remnan. Asam lemak bebas yang dihasilkan akan bergerak menembus jaringan otot dan jaringan lemak dibawah kulit, kemudian di jaringan tersebut asam lemak itu diubah kembali menjadi trigliserida yang berfungsi sebagai cadangan energi. Kilomikron remnan menuju ke hati. Pada jalur endogen trigliserida ditransportasikan dalam bentuk lipoprotein yang bernama Very Low Density Lipoprotein (VLDL). Trigliserida di luar hati dan berada di dalam jaringan akan dihidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase. Sisa hidrolisis kemudian dimetabolisasi oleh hati menjadi kolesterol Low Density Lipoprotein (LDL)

Lipoprotein adalah gabungan molekul lipid dan protein yang disintesis di dalam hati. Tiap jenis lipoprotein berbeda dalam ukuran, disintesa dan mengangkut berbagai jenis lipid dalam jumlah yang berbeda (Sunita A, 2002). Jenis lipoprotein yang dapat memicu terjadinya atherosclerosis yang terdiri dari total kolesterol, LDL, HDL, dan trigliserida. Partikel-partikel ini memiliki sifat khusus dan berbeda pada proses pembentukan atherosclerosis, sebagai berikut:

- e) LDL (low density lipoprotein), yang paling banyak mengangkut kolesterol di dalam darah.
- f) HDL (high density lipoprotein), mengangkut kolesterol lebih sedikit. Memiliki fungsi yaitu membuang kelebihan LDL kolesterol di pembuluh arteri kembali ke liver untuk diproses dan dibuang.

- g) VLDL (very low density lipoprotein), memiliki jumlah trigliserida yang terbanyak dalam darah. Sebagian VLDL diubah menjadi LDL.
- h) Trigliserida, yaitu jenis lemak dalam darah yang dapat mempengaruhi kadar kolesterol dalam darah. Kelebihan trigliserida akan dihidrolisa oleh enzim lipoprotein lipase, sisa hidrolisa kemudian oleh hati dimetabolisasikan menjadi LDL kolesterol

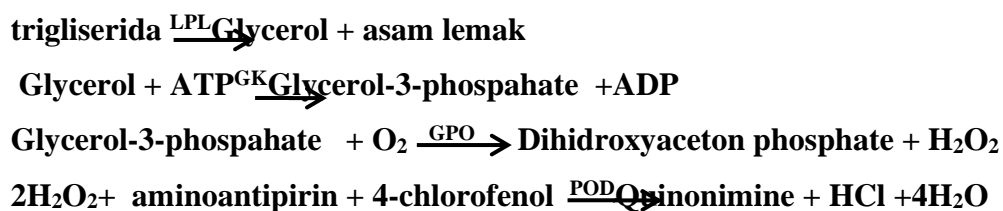
Keseimbangan lipid dalam darah diatur oleh beberapa mekanisme yaitu meningkatkan atau menurunkan kecepatan pengeluaran lipoprotein dalam darah dan mengurangi pembentukan lipoprotein serta jumlahnya yang masuk dalam darah. Kolesterol LDL meningkatkan risiko serangan jantung karena LDL dapat menembus dinding pembuluh darah dan menghambat aliran darah pada arteri koronaria yang mendarahi jantung. Kolesterol yang dibawa oleh HDL akan menurunkan risiko serangan jantung karena kolesterol ini membawa sisa kolesterol menuju hepar untuk dimetabolisme.

Kadar lipid serum normal menurut NCEP ATP III 2001 (mg/dL)

Profil lipid	Nilai	Kategori
Kolesterol total	<200	Optimal
	200-239	Diinginkan
	≥240	Tinggi
Kolesterol LDL	<100	Optimal
	100-129	Mendekati optimal
	130-159	Diinginkan
	160-189	Tinggi
	≥190	Sangat tinggi
Kolesterol HDL	<40	Rendah
	≥60	Tinggi
Trigliserida	<150	Optimal
	150-199	Diinginkan
	200-499	Tinggi
	≥500	Sangat tinggi

B. Prinsip Dasar Penentuan Kadar Trigliserida

Prinsip dasar percobaan adalah penentuan trigliserida melalui pemisahan enzimatis dengan lipoprotein lipase. Indikator enzimatis kolorimetri tes adalah indikator quinoneimine yang dihasilkan dari 4-aminoantipirine dan fenol oleh hidrogen peroksida dibawah pengaruh katalis peroksidase (reaksi trinder).



Prosedur

Panjang gelombang : Hg 546 nm (500 nm)

Optical path : 1 cm

Suhu inkubasi : 20 – 25°C atau 37°

Bahan :

Sampel Darah 10-15 ml

Pereaksi :

1. Good buffer pH 6.7 : 50 mmol/L
2. 4-klorofenol : 4 mmol/L
3. ATP : 2 mmol/L
4. Mg²⁺ : 15 mmol/L
5. Glycerokinase : ≥ 0,4 kU/L
6. Peroxidase ; ≥ 2 kU/L
7. Lipoprotein lipase : ≥ 2 kU/L
8. 4-aminoantipirine : 0,5 mmol/L
9. Glycerol-3-phosphate-oxidase : ≥ 5 kU/L
10. Standard : 200 mg/dL (2,3 mmol/L)

Spesimen (sampel biologis)

Serum, heparin plasma atau EDTA plasma

Stabilitas:

- 2 hari pada suhu 20-25°C,
- 7 hari pada suhu 7-8°C dan
- ≥ 1 tahun pada suhu -20°C

Alat :

Tabung reaksi

EDTA

Sentrifuge

Kit

Spektrofotometer

Miropipet

Pelaksanaan :

Dipipetkedalamtabungreaksi :

Pipet ke dalam kuvet	Blank	Standar	Sampel
Reagen	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Sampel	-	10 µl	10 µl
aquabides	10 µl	-	-
Campur, inkubasi selama 10 menit disuhu disuhu 37°C. Ukur absorbansi standardansampel terhadap blanko reagen dalam waktu 60 menit. (ΔA)			

PerhitunganKonsentrasi

Serum/plasma

$$C = \frac{\Delta A_{\text{sampel}}}{\Delta A_{\text{standar}}} [\text{mg/dl}] \times \text{Conc. of Std (mg/dL)}$$

Faktor konversi trigliserida

$$(\text{mg/dl}) \times 0.01126 = \text{trigliserida}(\text{mmol/l})$$

Hasil Pengamatan

No	Nama sampel	Asorbansi	Kadar (mg/dL)	Kadar (mmol/L)

Pertanyaan :

1. Jelaskan bagaimana biosintesis trigliserida di dalam tubuh?
2. Sebutkan dan jelaskan faktor-faktor apa saja yang mempengaruhi kadar trigliserida di dalam darah?
3. Sebutkan metode-metode yang dapat digunakan untuk penentuan kadar trigliserida?
4. Jelaskan metode dan prinsip pengukuran trigliserida yang digunakan dalam percobaan ini!
5. Jelaskan hasil pengukuran yang Anda dapatkan! Apakah kadarnya normal atau tidak?
6. Jelaskan mengapa trigliserida bisa tidak normal dalam tubuh!
7. Buatlah kesimpulan tentang percobaan ini!

LEMBAR PENILAIAN

TANGGAL PEMBELAJARAN :			
TANGGAL PENYERAHAN LAPORAN:			
NILAI KEHADIRAN		TOTAL NILAI	
NILAI RESPONSI			
NILAI AKTIVITAS			
NILAI HJSP			
CATATAN :			
TANDA TANGAN			
MAHASISWA	ASISTEN	DOSEN	

MATERI III
PENENTUAN KADAR PROTEIN TOTAL
(KUANTITATIF)

Tujuan Pembelajaran :

- a. Mengetahui penanganan awal sampel biologis pada penetapan kadar protein total
- b. Mengetahui metode dan cara penentuan kadar protein total secara kuantitatif

Pendahuluan

A. Dasar Teori

Protein merupakan makromolekul yang menyusun lebih dari separuh bagian dari sel. Protein menentukan ukuran dan struktur sel, komponen utama dari sistem komunikasi antar sel serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia di dalam sel. Karena itulah sebagian besar aktivitas penelitian biokimia tertuju pada protein khususnya hormon, antibodi dan enzim.

Semua jenis protein terdiri dari rangkaian dan kombinasi dari 20 asam amino. Setiap jenis protein mempunyai jumlah dan urutan asam amino yang khas. Di dalam sel, protein terdapat baik pada membran plasma maupun membran internal yang menyusun organel sel seperti mitokondria, retikulum endoplasma, nukleus dan badan golgi dengan fungsi yang berbeda-beda tergantung pada tempatnya. Protein-protein yang terlibat dalam reaksi biokimia sebagian besar berupa enzim banyak terdapat di dalam sitoplasma dan sebagian terdapat pada kompartemen dari organel sel. Protein merupakan kelompok biomakromolekul yang sangat heterogen. Ketika berada di luar makhluk hidup atau sel, protein sangat tidak stabil.

Protein diperkenalkan sebagai molekul makro pemberi keterangan, karena urutan asam amino dari protein tertentu mencerminkan keterangan genetik yang terkandung dalam urutan basa dari bagian yang bersangkutan dalam DNA yang mengarahkan biosintesis protein. Tiap jenis protein ditandai ciri-cirinya oleh:

- 1) Susunan kimia yang khas Setiap protein individual merupakan senyawa murni
- 2) Bobot molekular yang khas Semua molekul dalam suatu contoh tertentu dari protein murni mempunyai bobot molekular yang sama. Karena molekulnya yang besar maka protein mudah sekali mengalami perubahan fisik ataupun aktivitas biologisnya.
- 3) Urutan asam amino yang khas Urutan asam amino dari protein tertentu adalah terinci secara genetik. Akan tetapi, perubahan-perubahan kecil dalam urutan asam amino dari protein tertentu

Protein memegang peranan penting dalam berbagai proses biologi. Peran-peran tersebut antara lain:

- 1) Katalisis enzimatis Hampir semua reaksi kimia dalam sistem biologi dikatalisis oleh enzim dan hampir semua enzim adalah protein.
- 2) Transportasi dan penyimpanan Berbagai molekul kecil dan ion-ion ditransportasi oleh protein spesifik. Misalnya transportasi oksigen di dalam eritrosit oleh hemoglobin dan transportasi oksigen di dalam otot oleh mioglobin.
- 3) Koordinasi gerak Kontraksi otot dapat terjadi karena pergeseran dua filamen protein. Contoh lainnya adalah pergerakan kromosom saat proses mitosis dan pergerakan sperma oleh flagela.
- 4) Penunjang mekanis Ketegangan kulit dan tulang disebabkan oleh kolagen yang merupakan protein fibrosa.
- 5) Proteksi imun Antibodi merupakan protein yang sangat spesifik dan dapat mengenal serta berkombinasi dengan benda asing seperti virus, bakteri dan sel dari organisme lain.
- 6) Membangkitkan dan menghantarkan impuls saraf Respon sel saraf terhadap rangsang spesifik diperantarai oleh protein reseptor. Misalnya rodopsin adalah protein yang sensitif terhadap cahaya ditemukan pada sel batang retina. Contoh lainnya adalah protein reseptor pada sinapsis.
- 7) Pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi Pada organisme tingkat tinggi, pertumbuhan dan diferensiasi diatur oleh protein faktor pertumbuhan. Misalnya faktor pertumbuhan saraf mengendalikan pertumbuhan jaringan saraf. Selain itu, banyak hormon merupakan protein

B. Metode Biuret

Photometric tes berdasarkan metode biuret. Secara bersamaan ion tembaga dan protein membentuk kompleks warna biru violet dalam larutan alkali. Absorbansi kompleks berwarna ini berbanding lurus dengan konsentrasi protein dalam sampel.

Prosedur

Panjang gelombang : Hg 546 nm (540 nm)

Spektrofotometer : 500 nm

Suhu inkubasi : 20 – 25°C atau 37°

Bahan :

Sampel Darah 10-15 ml

Pereaksi :

1. Plasma / serum darah
2. Reagen 1

- Sodium hydroxide
- Potasium sodium tartrate

3. Reagen 2

- Sodium hydroxide
- Potasium sodium tartrate
- Potasium iodide
- Tembaga sulfat

Spesimen (sampel biologis)

Serum, heparin plasma atau EDTA plasma

Stabilitas:

- 6 hari pada suhu 20-25°C,
- 4 minggu pada suhu 4-8°C dan
- < 1 tahun bulan pada suhu -20°C

Alat :

Tabung reaksi

EDTA

Sentrifuge

Kit

Spektrofotometer

Miropipet

Pelaksanaan :

Pembuatan working reagen

Pipet ke dalam kuvet	Blank	Standar	Sampel
Sampel , std	-	20 µl	20 µl
aquabides	20 µl	-	-
reagen 1	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Campur, Ukur absorbansi A1 terhadap blanko reagen setelah 1-5 menit pada suhu 20-25°C /37°C dan tambahkan			
Reagent 2	250 µl	250 µl	250 µl
Campur, inkubasi selama 5 menit disuhu 20-25°C /37°C. dan ukur absorbansi A2 terhadap blanko reagen dalam waktu 60 menit. (ΔA)			

Sampel

Pipet ke dalam kuvet	Blank	Standar	Sampel
Sampel , std	-	20 µl	20 µl
aquabides	20 µl	-	-
reagen	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Campur,	inkubasi5	menitdisuhu	37°C.Ukurabsorbansi
standardansampel terhadap blankoreagendalamwaktu 60 menit. (ΔA)			

Nb: Buatlah *working reagen* dengan cara campurkan 4 bagian dari reagen 1 dengan 1 bagian dari reagen

Perhitungan Konsentrasi Protein

$$C = \frac{\Delta A_{\text{sampel}}}{\Delta A_{\text{standar}}} \times \text{conc. std [g/dl]}$$

Faktor konversi Kolesterol

$$(\text{g/dl}) \times 10 = \text{protein (g/L)}$$

Hasil Pengamatan

No	Nama sampel	Asorbansi	Kadar (mg/dL)	Kadar (g/L)

Pertanyaan :

1. Apa fungsi utama protein di dalam tubuh?

2. Jelaskan organ yang terkait dengan tinggi rendahnya kadar protein total!
3. Sebutkan dan jelaskan metode pengukuran kadar protein total dalam tubuh yang anda ketahui baik secara kualitatif maupun kuantitatif?
4. Jelaskan metode yang digunakan dalam percobaan ini!
5. Jelaskan hasil percobaan yang Anda dapatkan dalam percobaan ini!
6. Bagaimana cara mengatasi jika protein dalam tubuh tidak normal?
7. Buatlah kesimpulan percobaan ini!

LEMBAR PENILAIAN

TANGGAL PEMBELAJARAN :			
TANGGAL PENYERAHAN LAPORAN:			
NILAI KEHADIRAN		TOTAL NILAI	
NILAI RESPONSI			
NILAI AKTIVITAS			
NILAI HJSP			
CATATAN : 			
TANDA TANGAN			
MAHASISWA	ASISTEN	DOSEN	

MATERI IV
PENENTUAN KADAR ALBUMIN
(KUANTITATIF)

Tujuan Pembelajaran :

- a. Mengetahui penanganan awal sampel biologis pada penetapan kadar albumin
- b. Mengetahui metode dan cara penentuan kadar albumin secara kuantitatif

Pendahuluan

A. Dasar Teori

Albumin merupakan protein plasma yang paling banyak dalam tubuh manusia, yaitu sekitar 55-60% dan total kadar protein serum normal adalah 3,8-5,0 g/dl. Albumin terdiri dari rantai tunggal polipeptida dengan berat molekul 66,4 kDa dan terdiri dari 585 asam amino. Pada molekul albumin terdapat 17 ikatan disulfida yang menghubungkan asam-asam amino yang mengandung sulfur. Molekul albumin berbentuk elips sehingga dengan bentuk molekul seperti itu tidak akan meningkatkan viskositas plasma dan larut sempurna. Kadar albumin serum ditentukan oleh fungsi laju sintesis, laju degradasi, dan distribusi antara kompartemen intravaskular dan ekstrasvaskular. Cadangan total albumin 3,5-5,0 g/kg BB atau 250-300 g pada orang dewasa sehat dengan berat 70 kg, dari jumlah ini 42% berada di kompartemen plasma dan sisanya di dalam kompartemen ekstrasvaskular (Evans, 2002). Albumin manusia (human albumin) dibuat dari plasma manusia yang diendapkan dengan alkohol. Albumin secara luas digunakan untuk penggantian volume dan mengobati hipoalbuminemia

Secara detil fungsi dan peran albumin dalam tubuh adalah seperti yang akan dipaparkan berikut:

- a) Albumin sebagai pengikat dan pengangkut Albumin akan mengikat secara lemah dan reversibel partikel yang bermuatan negatif dan positif, dan berfungsi sebagai pembawa dan pengangkut molekul metabolit dan obat. Meskipun banyak teori tentang pentingnya albumin sebagai pengangkut dan pengikat protein, namun masih sedikit mengenai perubahan yang terjadi pada pasien dengan hipoalbuminemia (Nicholson dan Wolmaran, 2000; Khafaji dan Web, 2003; Vincent, 2003).
- b) Efek antikoagulan albumin Albumin mempunyai efek terhadap pembekuan darah. Kerjanya seperti heparin, karena mempunyai persamaan struktur molekul. Heparin bermuatan negatif pada gugus sulfat yang berikatan antitrombin III yang bermuatan positif, yang menimbulkan efek antikoagulan. Albumin serum juga bermuatan negatif (Nicholson dan Wolmaran, 2000).

- c) Albumin sebagai pendapar Albumin berperan sebagai buffer dengan adanya muatan sisa dan molekul albumin dan jumlahnya relatif banyak dalam plasma. Pada keadaan pH normal albumin bermuatan negatif dan berperan dalam pembentukan gugus anion yang dapat mempengaruhi status asam basa. Penurunan kadar albumin akan menyebabkan alkalosis metabolik, karena penurunan albumin 1 g/dl akan meningkatkan kadar bikarbonat 3,4 mmol/L dan produksi basa >3,7 mmol/L serta penurunan anion 3 mmol/L (Nicholson dan Wolmaran, 2000).
- d) Efek antioksidan albumin Albumin dalam serum bertindak memblokir suatu keadaan neurotoxic oxidant stress yang diinduksi oleh hidrogen peroksida atau copper, asam askorbat yang apabila teroksidasi akan menghasilkan radikal bebas (Gum dan Swanson, 2004).
- e) Selain yang disebut di atas albumin juga berperan mempertahankan integritas mikrovaskuler sehingga mencegah masuknya kuman-kuman usus ke dalam pembuluhdarah, sehingga terhindar dari peritonitis bakterialis.

Sintesis albumin hanya terjadi di hepar. Pada orang sehat kecepatan sintesis albumin adalah 194 mg/kg/hari (12-25 gram/hari). Pada keadaan normal hanya 20-30% hepatosit yang memproduksi albumin

Albumin dalam aspek klinis digunakan dalam beberapa hal yaitu:

- a) Hipovolemia Hipovolemia dicirikan oleh defisiensi volume intravaskular akibat kekurangan cairan eksternal atau redistribusi internal dan cairan ekstraselular. Jika terjadi hipovolemia dan disertai hipoalbuminemia dengan hidrasi yang memadai atau edema, lebih baik digunakan albumin 25% daripada albumin 5%. Jika hidrasi berlebihan, harus digunakan albumin 5% atau albumin 25% dilarutkan dengan kristaloid. Walaupun kristaloid atau koloid dapat digunakan untuk pengobatan emergency syok hipovolemik, human albumin memiliki waktu paruh intravaskular yang panjang.
- b) Hipoalbuminemia Hubungan antara hipoalbuminemia dengan hasil akhir yang buruk telah memotivasi para klinisi untuk memberikan albumin eksogen pada pasien dengan hipoalbuminemia. Human albumin telah diindikasikan untuk terapi hipoalbuminemia di Amerika Serikat dan negara lainnya. Tetapi masih terdapat kontroversi, meskipun hipoalbuminemia secara langsung menyebabkan hasil akhir pengobatan yang buruk (Khafaji dan Web, 2003). Hipoalbuminemia bukan suatu indikasi untuk pemberian albumin karena hipoalbuminemia tidak berhubungan langsung dengan plasma dan volume cairan lainnya, tetapi disebabkan kelebihan dan defisit cairan di intravaskular yang disebabkan dilusi, penyakit dan faktor distribusi

- c) Luka bakar Albumin diberikan pada jam ke 24 pasca trauma untuk membantu penarikan cairan dan ekstrasvaskuler ke intravaskuler.
- d) *Adult Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) Karakteristik ARDS adalah keadaan hipoproteinemia yang disebabkan oleh edema pulmonari, jika terjadi overload pulmonari disertai hipoalbuminemia, larutan albumin 25% akan memberikan efek terapeutik jika dikombinasi dengan diuretik.
- e) Nefrosis Albumin mungkin berguna untuk membantu pengobatan edema pada pasien nefrosis yang menerima steroid dan atau diuretik.
- f) Operasi By Pass Kardiopulmoner
- g) Untuk mengikat dan mengeluarkan bilirubin toksik pada neonatus dengan penyakit hemolitik.

B. Prinsip Metode

Bromokresol hijau pada pH sedikit asam dalam serum albumin dapat menghasilkan perubahan indicator warna dari hijau-kuning menjadi hijau-biru

Prosedur

Panjang gelombang : Hg 546 nm (540-600 nm)

Path optical : 1 cm

Suhu inkubasi : 20 – 25°C atau 37°

Bahan :

Sampel Darah 10-15 ml

Pereaksi

1. Citrate buffer, pH 4,2 : 30 mmol/L
2. Bromocresol green : 0,26 mmol/L
3. Standart : 5 g/dL

Spesimen (sampel biologis)

Serum, heparin plasma atau EDTA plasma

Stabilitas:

- 10 minggu pada suhu 20-25°C,
- 5 bulan pada suhu 4-8°C dan
- 3 bulan bulan pada suhu -20°C

Alat :

Tabung reaksi

EDTA

Sentrifuge

Kit

Spektrofotometer

Miropipet

Pelaksanaan

Pipet ke dalam kuvet	Blank	Standar	Sampel
Reagen	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Sampel	-	10 µl	10 µl
aquabides	10 µl	-	-
Campur, inkubasi selama 10 menit disuhu 37°C. Ukur absorbansi standard sampel terhadap blanko reagen dalam waktu 60 menit. (ΔA)			

Perhitungan Konsentrasi (Serum/plasma)

$$C \text{ albumin} = \frac{\Delta A_{\text{sampel}}}{\Delta A_{\text{standar}}} \times \text{conc. std [g/dl]}$$

Faktor konversi Kolesterol

(g/dl) X 144,9 = albumin (µmol/L)

Hasil Pengamatan

No	Nama sampel	Asorbansi	Kadar (g/dL)	Kadar (µmol/L)

Pertanyaan :

1. Apa perbedaan fungsi protein dan albumin di dalam tubuh?
2. Sebutkan dan jelaskan apa saja fungsi pengukuran kadar albumin dalam untuk dalam kebutuhan analisis klinik?

3. Sebutkan dan jelaskan apa saja metode pengukuran kadar albumin di dalam tubuh untuk kebutuhan analisis klinik?
4. Jelaskan metode yang digunakan dalam percobaan ini!
5. Jelaskan hasil yang Anda dapatkan dari percobaan ini!
6. Jelaskan mengapa kadar albumin bisa tidak normal di dalam tubuh!
7. Buatlah kesimpulan dari percobaan ini!

LEMBAR PENILAIAN

TANGGAL PEMBELAJARAN :			
TANGGAL PENYERAHAN LAPORAN:			
NILAI KEHADIRAN		TOTAL NILAI	
NILAI RESPONSI			
NILAI AKTIVITAS			
NILAI HJSP			
CATATAN :			
TANDA TANGAN			
MAHASISWA	ASISTEN	DOSEN	

MATERI V
PENENTUAN KADAR ASAM URAT
(KUANTITATIF)

Tujuan Pembelajaran :

- a. Mengetahui penanganan awal sampel biologis pada penetapan kadar asam urat
- b. Mengetahui metode dan cara penentuan kadar asam urat secara kuantitatif

Pendahuluan

A. Dasar Teori

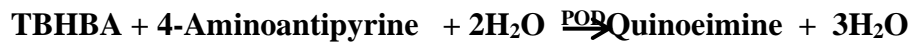
Asam urat adalah produk akhir atau produk buangan yang dihasilkan dari metabolisme/pemecahan purin. Asam urat sebenarnya merupakan antioksidan dari manusia dan hewan, tetapi bila dalam jumlah berlebihan dalam darah akan mengalami pengkristalan dan dapat menimbulkan gout. Asam urat mempunyai peran sebagai antioksidan bila kadarnya tidak berlebihan dalam darah, namun bila kadarnya berlebih asam urat akan berperan sebagai prooksidan

Pembentukan asam urat dalam darah juga dapat meningkat yang disebabkan oleh factor dari luar terutama makanan dan minuman yang merangsang pembentukan asam urat. Adanya gangguan dalam proses ekskresi dalam tubuh akan menyebabkan penumpukan asam urat di dalam ginjal dan persendian. Jalur kompleks pembentukan asam urat dimulai dari ribose 5-phosphate, suatu pentose yang berasal dari glycidic metabolism, dirubah menjadi PRPP (phosphoribosyl pyrophosphate) dan kemudian phosphoribosilamine, lalu ditransformasi menjadi inosine monophosphate (IMP). Dari senyawa perantara yang berasal dari adenosine monophosphate (AMP) dan guanosine monophosphate (GMP), purinic nucleotides digunakan untuk sintesis DNA dan RNA, serta inosine yang 6 kemudian akan mengalami degradasi menjadi hypoxanthine, xanthine dan akhirnya menjadi uric acid

Kadar asam urat dapat diketahui melalui hasil pemeriksaan darah dan urin. Nilai rujukan kadar darah asam urat normal pada laki-laki yaitu 3.6 - 8.2 mg/dl sedangkan pada perempuan yaitu 2.3 - 6.1 mg/d

B. Prinsip Penentuan Kadar Asam Urat

Penetapan kadar asam urat menggunakan metode enzimatik fotometri tes menggunakan TBHBA (2,4,6 - tribromo - 3 -hidroksibenzoat) dengan prinsip kerja enzimatik fotometri tes ini adalah asam urat dioksidasi menjadi allatoxin oleh uricase . hidrogen peroksida geberated bereaksi dengan 4 aminoantripyrene dan 2,4,6 - tribromo - 3 asam hidroksibenzoat (TBHBA) ke quinoneimine



Prosedur

Panjang gelombang : Hg 546 nm (500 -550 nm)

Spektrofotometer : 520 nm

Suhu inkubasi : 20 – 25°C atau 37°

Bahan :

Sampel Darah 10-15 ml

Pereaksi :

Reagen 1

- Phosphate buffer pH 7,0 100 mmol/L
- TBHBA (2,4,6-tribromo-3 hydroxybenzoic acid) 1,25 mmol/L

Reagen 2

- Phosphate buffer pH 7,0 100 mmol/L
- 4-aminoantipyrine 1,5 mmol/L
- K₄[Fe(CN)₆] 50 μmol/L
- Peroxidase (POD) ≥ 10 kU/L
- Uricase ≥ 150 kU/L

Spesimen (sampel biologis)

Serum, heparin plasma atau EDTA plasma

Stabilitas:

- 3 hari pada suhu 20-25°C,
- 7 hari pada suhu 4-8°C dan
- 6 bulan pada suhu -20°C

Alat :

Tabung reaksi

EDTA

Sentrifuge

Kit

Spektrofotometer

Miropipet

Pelaksanaan :

Pembuatan working reagen

Pipet ke dalam kuvet	Blank	Standar	Sampel
Sampel , std	-	20 µl	20 µl
aquabides	20 µl	-	-
reagen 1	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Campur, Ukur absorbansi A1 terhadap blanko reagen setelah 1-5 menit pada suhu 20-25°C /37°C dan tambahkan			
Reagent 2	250 µl	250 µl	250 µl
Campur, inkubasi selama 5 menit disuhu 20-25°C /37°C. dan ukur absorbansi A2 terhadap blanko reagen dalam waktu 60 menit. (ΔA)			

Sampel

Pipet ke dalam kuvet	Blank	Standar	Sampel
Sampel , std	-	20 µl	20 µl
aquabides	20 µl	-	-
reagen	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Campur, inkubasi 5 menit disuhu 37°C. Ukur absorbansi standard sampel terhadap blanko reagen dalam waktu 60 menit. (ΔA)			

Nb: Buatlah *working reagen* dengan cara campurkan 4 bagian dari reagen 1 dengan 1 bagian dari reagen

Perhitungan Konsentrasi Protein

$$C = \frac{\Delta A_{\text{sampel}}}{\Delta A_{\text{standar}}} \times \text{conc. std [g/dl]}$$

Faktor konversi Kolesterol

$$(\text{mg/dl}) \times 59,48 = \text{asam urat (mmol)}$$

Hasil Pengamatan

No	Nama sampel	Asorbansi	Kadar (mg/dL)	Kadar (mmol/L)

Pertanyaan :

1. Sebutkan dan jelaskan sumber –sumber yang dapat meningkatkan asam urat dalam darah?
2. Jelaskan faktorapa yang dapat menyebabkan penurunan dan peningkatan kadar asam urat dalam darah?
3. Jelaskan gejala apa yang terjadi jika kadar asam urat meningkat!
4. Sebutkan dan jelaskan metode pengukuran kadar asam urat dalam tubuh yang anda ketahui baik secara kualitatif maupun kuantitatif?
5. Jelaskan metode yang digunakan dalam percobaan ini!
6. Jelaskan hasil yang didapatkan dalam percobaan ini! Apakah kadar asam urat normal atau tidak?
7. Buatlah kesimpulan tentang percobaan ini!

PENENTUAN KADAR KALSIUM
(KUANTITATIF)

Tujuan Pembelajaran :

- a. Mengetahui penanganan awal sampel biologis pada penetapan kadar kalsium
- b. Mengetahui metode dan cara penentuan kadar kalsium secara kuantitatif

Pendahuluan

A. Dasar Teori

Kalsium merupakan mineral yang paling banyak terdapat di dalam tubuh. Kalsium dibutuhkan di semua jaringan tubuh, khususnya tulang. Sekitar 99% kalsium tubuh berada pada tulang dan sisanya tersebar di seluruh tubuh dalam aneka cairan tubuh. Hormon paratiroid mengontrol tingkat kalsium dalam darah. Jika tingkat ini turun di bawah poin tertentu, hormon ini dilepas dalam aliran darah dan meningkatkan kalsium darah dengan beberapa cara. Karena kalsium penting bagi kesehatan otak dan sel maka tulang mungkin berkorban untuk memastikan kalsium yang memadai tetap ada dalam darah. Vitamin D, seperti halnya hormon paratiroid, bertanggung jawab untuk mempertahankan tingkat kalsium tertentu dalam darah. Hormon kalsitonin juga digunakan untuk melindungi tulang dari efek penyerapan yang disebabkan oleh hormon paratiroid.

Fungsi Kalsium :

1. Bersama fosfor membentuk matriks tulang, pembentukan ini dipengaruhi oleh vitamin D. Peranan kekurangan kalsium pada osteoporosis harus dipertimbangkan bersamaan dengan kekurangan vitamin D. Kekurangan vitamin D akut menyebabkan osteomalasia, yaitu kegagalan untuk memineralkan jantung. Vitamin D didapat dari sinar matahari dimana vitamin ini diproduksi oleh sinar ultraviolet pada bentuk tidak aktif di kulit. Vitamin ini diubah dan disimpan dan diubah lagi menjadi bentuk aktif di dalam hati dan ginjal. Setelah diaktifkan, vitamin D meningkatkan penyerapan kalsium dari usus dan merangsang ginjal untuk menyerap kembali kalsium dari urin kembali ke aliran darah. Jadi, jumlah vitamin D sangat penting untuk menjaga dan mempertahankan keseimbangan kalsium. Banyak penelitian yang menyatakan bahwa para wanita yang kurang mendapat sinar matahari memiliki kadar vitamin D yang sedikit lebih rendah. Berkurangnya massa tulang yang disebabkan oleh kekurangan vitamin D sebagian dapat dicegah dengan mengonsumsi suplemen vitamin. Suplemen vitamin D dapat diperoleh dari sinar matahari, multi vitamin, sayuran, dan formulasi vitamin D khusus. Vitamin ini juga ditemukan dalam jumlah kecil pada telur, susu, dan ikan (Lane, 2001).
2. Membantu proses penggumpalan darah.

3. Mempengaruhi penerimaan rangsang pada otot dan saraf

Sumber kalsium susu dan produk olahannya seperti yogurt dan keju serta campuran makanan yang mengandung keju memiliki kandungan tertinggi per takaran saji. Susu kedelai dan beras, yogurt, tofu, dan keju mengandung jumlah kalsium yang setara dengan kalsium dalam produk-produk olahan susu sapi. Produk ikan kaleng yang menyertakan tulangnya (salmon atau sarden) juga mengandung banyak kalsium, tetapi irisan ikan segar tanpa tulang bukan sumber kalsium tinggi.

- 1) Kekurangan dan Kelebihan Kalsium Dampak negatif kekurangan mineral kerap tidak kelihatan sebelum mereka mencapai usia dewasa. Kekurangan kalsium saat remaja merupakan penyebab osteoporosis di usia tua. Kekurangan kalsium dapat menyebabkan: Karies dentis (kerusakan gigi).
- 2) Pertumbuhan tulang menjadi tidak sempurna.
- 3) Sukar terjadi penggumpalan darah.
- 4) Terjadinya kekejangan otot.

Selain akibat kekurangan kalsium di atas, akibat ketidakseimbangan kalsium dan fosfor juga dapat menimbulkan kerugian. Karena fosfor dapat meningkatkan hormon paratiroid. Jika ketidakseimbangan ini tidak diatasi, maka kekurangan kalsium terus terjadi sementara penumpukan fosfor juga terus berlanjut

B. Prinsip Metode

Arsenazo III secara kimiawi stabil dan memiliki afinitas sangat tinggi untuk kalsium pada kisaran pH netral. Dalam sistem pengujian ini, Arsenazo III membentuk kompleks biru kalsium Arsenazo III dengan maksimum absorbansi pada 650 nm. Konsentrasi kalsium sebanding dengan absorbansi biru berwarna kompleks Arsenazo III-kalsium.

Prosedur

Panjang gelombang : Hg 623-650nm (630-670 nm)

Path optical : 1 cm

Suhu inkubasi : 20 – 25°C atau 37°

Bahan :

Sampel Darah 10-15 ml

Pereaksi

- Phosphate Buffer, pH 7,5
- 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid
- Arsenazo III

- Detergents

Spesimen (sampel biologis)

Serum, heparin plasma atau EDTA plasma

Stabilitas:

- 10 minggu pada suhu 20-25°C,
- 5 bulan pada suhu 4-8°C dan
- 3 bulan bulan pada suhu -20°C

Alat :

Tabung reaksi

EDTA

Sentrifuge

Kit

Spektrofotometer

Miropipet

Pelaksanaan

Pipette into test tubes	Blank	Std./Cal.	Sample
Reagent	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Sample	-	-	10 µl
Std./Cal.	-	10 µl	-
Water	10 µl	-	-

Mix incubate for 5 min. at 20 – 25°C/37°C. Measure absorbance of std./cal. and sample against reagent blank. The color is stable for at least 1 hour.

Perhitungan Konsentrasi (Serum/plasma)

$$\text{Calcium [mg/dl]} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Std./Cal.}} \times \text{Conc. Std./Cal. [mg/dl]}$$

UNIT CONVERSION

$$\text{mg/dl} \times 0.2495 = \text{mmol/L}$$

Hasil Pengamatan

No	Nama sampel	Asorbansi	Kadar (mg/dL)	Kadar (mmol/L)

Pertanyaan :

1. Sebutkan dan jelaskan kelainan metabolisme kalsium di dalam tubuh?
2. Jelaskan faktor yang mempengaruhi tidak normalnya kadar kalsium didalam tubuh!
3. Sebutkan dan jelaskan metode pengukuran kadar kalsium di dalam tubuh yang anda ketahui baik secara kualitatif maupun kuantitatif untuk kebutuhan analisis klinik?
4. Jelaskan metode yang digunakan dalam percobaan ini!
5. Jelaskan hasil pengukuran yang Anda dapatkan!
6. Buatlah kesimpulan dari percobaan ini!

LEMBAR PENILAIAN

TANGGAL PEMBELAJARAN :			
TANGGAL PENYERAHAN LAPORAN:			
NILAI KEHADIRAN		TOTAL NILAI	
NILAI RESPONSI			
NILAI AKTIVITAS			
NILAI HJSP			
CATATAN :			
TANDA TANGAN			
MAHASISWA	ASISTEN	DOSEN	

DAFTAR PUSTAKA

- Christian, G.D., 1994, *Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Lewandrowski, K., (Editor) 2002, *Clinical Chemistry, Laboratory management and clinical correlations*, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, A Wolters Kluwer Company, Philadelphia
- Richerich, R and Colombo, J.P., 1981. *Dinamical Chemistry Theory, Practice And Interpretation*. John Wily dan Sons, Chichester
- Stryer, L., 1995, *Biochemistry, Fourth Edition*. W.H. Freeman And Company, New York