

PRAKTIKUM pH METER, PERSIAPAN LARUTAN PENYANGGA DAN KROMATOGRAFI

- Tujuan:**
- Dapat mengerti prinsip-prinsip dasar mengenai larutan buffer
 - Latihan penggunaan pH meter
 - Latihan persiapan buffer dan titrasi
 - Latihan pembuatan dan penggunaan larutan stok serta pengenceran
 - Latihan pembuatan dan interpretasi grafik
 - Perpisahan component daun dengan teknik kromatografi kolom

Teori dasar pH dan Larutan Buffer

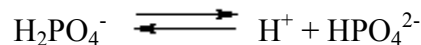
Teori dasar: pH merupakan skala yang menunjukkan kadar hidrogen yang melarut dalam larutan.

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

Nilai pH berada di antara 1 (sangat asam → kadar H^+ tinggi) dan 14 (sangat basa/alkali → kadar H^+ rendah)

Semua reaksi biokimiawi terjadi di dalam larutan, dan kebanyakan reaksi tersebut sangat dipengaruhi oleh keasaman lingkungan/larutan itu. Di dalam badan kita (pada darah dan cairan ekstraselular kita), sistem buffer bikarbonat ($\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) merupakan sistem buffer terpenting. Pada urin, ion amonia (NH_3) dan amonium (NH_4^+) berfungsi sebagai sistem buffer dan pH intraselular diatur terutama oleh anion fosfat (H_2PO_4^-) dan protein. Reaksi biokimiawi dipengaruhi oleh keasaman lingkungan oleh karena kebanyakan molekul (khususnya protein/enzim) mempunyai bagian yang dapat bersifat bermuatan atau tidak, tergantung pHnya. Sifat bermuatan atau netral akan mempengaruhi aktivitasnya. Jadi ketika kita melakukan penelitian yang termasuk reaksi biokimiawi, caranya untuk mempertahankan pH pada tingkat yang tepat perlu dipikirkan.

Lihatlah sistem buffer fosfat sebagai contoh. Sistem buffer fosfat terdiri dari ion dihidrogen fosfat (H_2PO_4^-) yang merupakan pemberi hidrogen (asam) dan ion hidrogen fosfat (HPO_4^{2-}) yang merupakan penerima hidrogen (basa). Kedua-duanya ion tersebut berada dalam keseimbangan dan hubungannya bisa ditulis sebagai rumus berikutnya:



Ketika ion-ion hidrogen ditambah dalam larutan yang ditahankan oleh buffer fosfat, keseimbangan yang di atas akan ke arah kiri (yaitu, ion H^+ yang kelebihan akan bereaksi dengan ion hidrogen fosfat dan menghasilkan ion dihidrogen fosfat). Ketika larutan semakin alkali (basa) keseimbangan yang di atas akan ke arah kanan (yaitu, ion OH^- yang kelebihan akan bereaksi dengan ion hidrogen dan menghasilkan air). Konstan keseimbangan (K_a) untuk buffer fosfat adalah:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad \text{kalaupun disusun kembali....} \quad [\text{H}^+] = K_a \frac{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}{[\text{HPO}_4^{2-}]}$$

bila diuraikan didapat rumus $-\log[\text{H}^+] = -\log K_a \cdot -\log \left[\frac{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}{[\text{HPO}_4^{2-}]} \right]$

atau $\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \right)$

Rumus tersebut bagi kondisi umum adalah $\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right)$ dan disebutkan rumus *Henderson-Hasselbalch*.

Ada tiga macam ion fosfat, dan nilai $\text{p}K_a$ adalah seperti berikutnya:

ion fosfat	H_3PO_4	H_2PO_4^-	HPO_4^{2-}
nilai $\text{p}K_a$	~2	~7	~12

Pada 25°C, nilai K_a untuk buffer fosfat adalah $6,23 \times 10^{-8}$. Ketika kadar asam ($H_2PO_4^-$) dan basa (HPO_4^{2-}) sama, pH adalah sama dengan pKa atau $-\log(6,23 \times 10^{-8}) = 7,21$. Larutan buffer monofosfat dapat menahankan pHnya dekat dengan nilai 7,2.

Alat dan Bahan:

stel & klem	pipet Mohr	akudes	0,25M NaH_2PO_4
kertas timbangan	pipet otomatis	tabung reaksi	0,25M Na_2HPO_4
pH meter	otomatis stirrer	rak tabung	larutan 5% glukosa
Reagensia Benedict	pipet tetes	spidol	water bath
natrium bikarbonat $NaHCO_3$	aseton	thinner (petroleum ether)	etanol
kolum	beaker		

Setiap grup praktikum akan melakukan titrasi dengan suatu larutan buffer serta akuades dan setiap praktikan wajib mencoba semua kegiatan pengenceran/dilusi.

PENGUNAAN PH METER

Catatan-catatan dari demonstrasi penggunaan pH meter:

PERSIAPAN BUFFER DAN TITRASI:

Ukurkan pH 0.25M larutan monohidrogen fosfat (Na_2HPO_4) yang dibuat minggu yang lalu.

pH = _____

Ukurkan pH 0.25M larutan dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4) yang dibuat minggu yang lalu.

pH = _____

Cara Kerja Umum untuk Titrasi Buffer Fosfat

- 1) Sediakan 1 beaker 100mL dan isi dengan larutan natrium fosfat monohidrogen (Na_2HPO_4) yang secukupnya. Pada lokasi pH meter, masukkan temperature probe ke dalam beaker tsb, pakai magnet dan otomatis stirrer dengan kecepatan pelan. Pakailah statif dan klem supaya elektroda pH meter dipegang dari bagian plastic yang di atas dan tipnya dimasukkan ke dalam larutan yang ingin diukur. Janganlah sampai tip elektroda pH meter kena magnet yang berputar.
- 2) Ukur pH dengan pH meter. Tambahkan **500 µl** larutan natrium fosfat dihidrogen (NaH_2PO_4) dengan pipet Mohr, tunggu ~5 detik dan ukur pHnya lagi. Teruskan titrasi dengan natrium fosfat dihidrogen (NaH_2PO_4) sampai pH yang bertujuan tercapai.

Siapkan ~75mL 0.125M buffer fosfat pH tertentu (6,3; 6,8; 7,0; 7,5; 7,8) pada 25 ° C (temperatur ruangan) dari larutan stok(0.25M) Na_2HPO_4 dan larutan stok (0.25M) NaH_2PO_4

~volume Na_2HPO_4 yang dipakai _____

~volume NaH_2PO_4 yang dipakai _____

Caranya supaya dapat konsentrasi 0,125M buffer fosfat? _____

Tabel 1: Ringkasan hasil pembuatan buffer fosfat

– kumpulkan data dari grup praktikum yang lain

<i>pH bertujuan</i>	<i>Volume 0.25M Na₂HPO₄</i>	<i>Volume 0.25M NaH₂PO₄</i>	<i>Volume 0,125M buffer fosfat yg disiapkan</i>
6,3			
6,8			
7,0			
7,5			
7,8			

PENGECERAN:

Ingatlah bahwa....

gram unsur dalam larutan = C x V

dimana satuan C sama dengan g/liter dan satuan V sama dengan liter

contoh (larutan sukrosa): volume = 0.2 liter; kadar = 50 g/l.

jadi C x V = 50 g/liter x 0.2 liter = 10 g sukrosa yang dibutuhkan.

atau supaya tahu kadarnya:

contoh: larutan sukrosa di atas diencerkan ke dalam volume 2 litre.....

$$C \times V = 10g$$

$$\therefore C = 10g / V = 10g / (2 \text{ liter}) = 5g/liter$$

Soal pengenceran: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

Encerkan larutan dengan konsentrasi yang diketahui (C_1) supaya dapat konsentrasi (C_2) dan volume (V_2) tertentu ...jadi volume stok yang dibutuhkan adalah: $V_1 = (C_2 \times V_2) / C_1$

Pengenceran serial: *doubling dilution* dan *decimal dilution*

Caranya untuk *doubling dilution*

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

Caranya untuk *decimal dilution*

nomor tabung	1	2	3	4	5	6	7
pengenceran urea/glukosa	stok	0,3X	0,1X	0,03X	0,01X	0,003X	0,001X
faktor	-	3	10	30	100	300	1000

Bagaimanakah pengertian *nomenclature* bagi pengenceran:

<i>nomenclature</i>	artinya	contoh
1:1	1 bagian stok dalam 1 bagian pelarut	Siapkan 5 ml 1:1 %5 glukosa Volume final = 5 ml Jumlah "bagian" = 1+1 = 2 Volume per bagian = 5ml/2 = 2,5ml Jadi 2,5ml stok 5% glukosa dicampur dengan 2,5 ml akudes
0,3X	pengenceran sepertiga (1/3) 1 bagian stok dalam 2 bagian pelarut	Siapkan 1 ml 0,3X %5 glukosa Volume final = 1 ml Jumlah "bagian" = 1+ 2 = 3 Volume per bagian = 1 ml/3 = 0,33 ml Jadi 0,33 ml stok 5% glukosa dicampur dengan 0,67 ml akudes
pada faktor 4	pengenceran seperempat (1/4) 1 bagian stok dalam 3 bagian pelarut	Siapkan 2 ml pengenceran pada faktor 4, %5 glukosa Volume final = 2 ml Jumlah "bagian" = 4 Volume per bagian = 2 ml/4 = 0,5 ml Jadi 0,5 ml stok 5% glukosa dicampur dengan 1,5 ml akudes

Latihan pengenceran: Setiap grup praktikum mengerjakan semuanya.

Siapkan 10-12 tabung reaksi dalam rak tabung. Tandainya dengan spidol. Encerkan ke dalam tabung reaksi supaya volume yang disiapkan ± 2 ml. Pikirkanlah dulu supaya cara pengenceran yang Anda pakai efisien bagi bahan stok maupun alat/waktu.

1. 1:10 5% glukosa
2. 2:3 5% glukosa
3. Pengenceran serial: 0,1X, 0,01X dan 0,001X 5% glukosa
4. Pengenceran serial: 0,3X, 0,03X dan 0,003X 5% glukosa
5. Pengenceran serial: pada faktor 2, 4, 8 dan 16 5% glukosa

Pemeriksaan pengenceran dengan Reaksi Benedict:

Reaksi Benedict dipakai untuk menunjukkan keadaan glukosa atau sakarida lain yang bersifat "*reducing sugar*". Kita akan menggunakan reaksi tersebut untuk memeriksa pengenceran yang dibuat diatas.

1. Sediakan 10-12 tabung reaksi lagi dan tandai dengan spidol sesuai dengan pengenceran yang di atas.
2. Masukkan 5 ml reagensia Benedict ke dalam setiap tabung reaksi. Tambah 8 tetes larutan glukosa yang telah diencerkan.
3. Dikocok hingga homogen dan panaskan dalam water bath dengan air yang mendidih selama 5 menit.
4. Biarkan dingin dan perhatikan reaksinya
5. Isi hasil yang Anda peroleh dalam Tabel 2.

Tabel 2: Hasil Pengenceran stok glukosa

tabung	pengenceran 5% glukosa	konsentrasi yg diprediksikan	Hasil pemeriksaan Benedict (warna)	Interpretasi hasil sesuai atau tidak dengan konsentrasi yang diprediksikan?
1	1:10			
2	2:3			
3	0,1X			
4	0,01X			
5	0,001X			
6	0,3X			
7	0,03X			
8	0,003X			
9	pada faktor 2			
10	pada faktor 4			
11	pada faktor 8			
12	pada faktor 16			

Interpretasi:

Warna	Penilaian	Kadar kh (khusus reaksi Benedict)
Biru jernih	negatif	0
Hijau/kuning hijau	+	<0,5%
Kuning/kuning kehijauan	++	0,5 – 1,0%
Jingga	+++	1,0 – 2,0%
Merah (ada endapan)	++++	>2,0%

Demo teknik kromatografi: ekstrak daun dengan pelarut petroleum ether, aseton, 70%etanol

**Kegiatan demo ini diadaptasi dari bahan:*

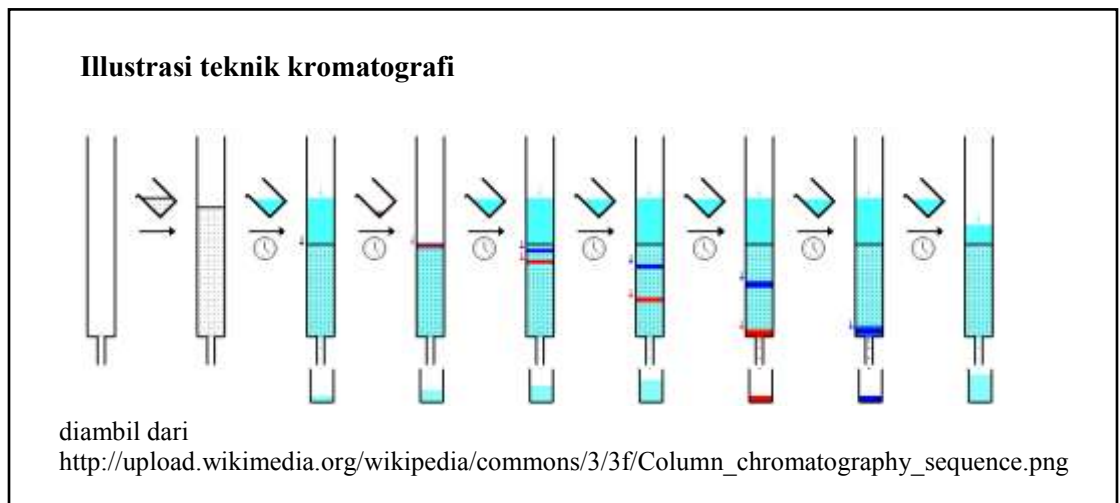
Kimbrouah DR (1992), Supermarket Column Chromatography of Leaf Pigments. *J Chem Educ* **69**(12):987-988.

Cara Kerja”

1. Kolum yang jaraknya sama dengan 20-40 ml disiapkan dengan larutan NaHCO₃ yang jenuh dalam pelurat petroleum ether.
2. 2 atau 3 helai daun dihancurkan dengan 2-3 ml aseton di gilingan (*mortar dan pestle*). Ekstrak daun tersebut ditaruh di atas kolum. Bagian bawa kolum dibuka dan cairan dikumpulkan dalam beaker.
3. Ketika ekstrak daun turun dekat dengan permukaan kolum, tambah petroleum ether (kira-kira 5 ml) dari atas.
 - Pada teorinya, petroleum ether akan menyebabkan bagian kimiawi yang bersifat agak nonpolar keluar dari ekstrak daun. Tergantung jenis daunnya, tapi biasanya sebuah pita yang berwarna hijau muncul dibawah ekstrak yang berisi klorofil dan karotenoid.
4. Sesudah pita hijau tersebut muncul dan ketika larutan petroleum ether turun dekat dengan permukaan kolum, tambah aseton (kira-kira 5 ml) dari atas.
 - Pada teorinya, aseton akan menyebabkan bagian kimiawi yang bersifat nonpolar keluar dari ekstrak daun. Tergantung jenis daunnya, tapi biasanya sebuah pita yang berwarna kuning muncul dibawah ekstrak yang berisi fitokrom.

3. PRAKTIKUM PH METER, PERSIAPAN LARUTAN PENYANGGA DAN KROMATOGRAFI

5. Sesudah pita kuning tersebut muncul dan ketika larutan aseton turun dekat dengan permukaan kolom, tambah 70% etanol (kira-kira 5 ml) dari atas.
 - Pada teorinya, 70% etanol akan menyebabkan bagian kimiawi yang bersifat polar keluar dari ekstrak daun. Tergantung jenis daunnya, tapi biasanya sebuah pita yang berwarna merah-kecoklatan muncul dibawah ekstrak yang berisi flavanoid.



6. Biasanya teknik kolom kromatografi dilaksanakan dalam proses pemurnian suatu protein atau molekul lain, jadi alat kromatografi yang benar harus lengkap dengan sistem pengumpulan (*fraction collector*) supaya bagian yang ingin kita murnikan dipisahkan dari bagian-bagian lain.



Laporan Praktikum pH meter, Persiapan Larutan Penyangga dan Kromatografi

Buat laporan praktikum, satu per kelompok. Jelaskan tujuannya dengan kata-kata Anda sendiri. Kalau ada perubahan dari yang ditulis di bahan penuntun praktikum ini, catatlah dalam laporan.

Bahas secara singkat cara penggunaan pH meter dan teknik kromatografi, kesimpulan yang dapat Anda ambil dari bagian pembuatan buffer fosfat serta poin-poin yang boleh Anda simpulkan dari hasil pengenceran larutan stok glukosa.

Kalau ada hasil yang berbeda dari yang diharapkan, berikan beberapa alasan/penyebab yang memungkinkan untuk menjelaskan perbedaan tersebut. “Kesalahan teknik” kurang cukup sebagai penjelasan – harus menerangkan kesalahan seperti apa yang mungkin menyebabkan hasil yang dibahas!!

Berikanlah saran atas praktikum ini dan usulan supaya praktikum selanjutnya lebih baik lagi.

Upload laporan kelompok Anda ke situs web kita dalam bentuk file *.pdf. Tolonglah sebutkan nama anggota kelompok dalam judul laporan, misalnya “Laporan Praktikum 3 BM506 Ani & Beni”.