

# DETERMINASI PIGMEN DAN PENGUKURAN KANDUNGAN KLOROFIL DAUN<sup>1</sup>

Oleh : Drs. Suyitno Al. MS<sup>2</sup>

## PENGANTAR

Pigmen daun dapat dideterminasi secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, macam pigmen daun dapat dideteksi dengan metode kromatografi. Jumlah pigmen tertentu dari daun seperti klorofil dapat ditentukan dengan metode kolorimetri yaitu dengan spektrofotometer UV.

## Kegiatan 1

**Topik** : Determinasi pigmen daun dengan kromatografi kertas

**Tujuan** : Untuk mengidentifikasi macam pigmen pada jaringan daun

## Prinsip Dasar

- Daun sebagai organ fotosintetik memiliki bermacam-macam pigment aseptor elektron yang mendukung proses fotosintesis. Untuk melihat macam pigmen harus dilakukan ekstraksi jaringan daun, kemudian dilakukan pemisahan.
- Secara umum, ada beberapa metode pemisahan bahan yang dapat digunakan, meliputi kromatografi kertas (KKt), kromatografi lapis tipis dengan silica gell (KLT), kromatografi gas-cair, dan elektroforesis.
- Dengan menggunakan pengembang yang sesuai untuk bermacam-macam pigment, maka kelompokan molekul menurut besar kecilnya ukuran akan dapat merambat naik dalam kertas kromatografi dan menjadi terpisah-pisah.
- Beberapa kelompok pigmen ada yang dapat dilihat dengan mata biasa, dan beberapa senyawa pigment yang lain dapat dilihat dengan bantuan larutan penyemprot bercak dan dilihat dibawah lampu UV. Di antara ke empat metode tersebut, KKt adalah metode yang paling sederhana.

---

<sup>11</sup> Materi disampaikan pada pelatihan Guru-guru Biologi RSBI D.I.Y. di Jurdik. Biologi FMIPA UNY, 7 Ags 2010

<sup>2</sup> Staf Pengajar Jurdik. Biologi FMIPA UNY

### Alat dan Bahan

Alat : Tabung Jar, kertas Whatman 3, alat penotol ekstrak, alat pengestrak, penutup tabung jar, gelas piala

Bahan : Daun berwarna-warni yang segar, pelarut organik : aceton, petrolium eter

Larutan pengembang → Aceton : PE = 1 : 9

### Cara Kerja

1. Geruslah atau ekstraklah daun dengan sedikit aceton.
2. Totolkan dengan alat penotol ekstrak pada kertas kromatografi, lk 1,5 Cm dari dasar kertas. Jarak antar titik totolan ekstrak minimal 1 cm. Pada bagian ujung kertas pada jarak lk 2 cm dari ujung, tetapkan garis batas menggunakan pensil.
3. Masukkan kertas tersebut dalam larutan pengembang yang telah disiapkan dalam tabung jar dengan ketinggian larutan 1 cm. Bercak totolan jangan sampai terendam larutan secara langsung.
4. Biarkan larutan pengembang merambat naik di kertas sambil membawa pigmen-pigmen yang ada.
5. Hentikan pemisahan pigment setelah salah larutan pengembang mencapai batas atas tersebut. Amati kelompok-kelompok warna yang muncul pada kertas. Tentukan nilai Rf masing-masing kelompok pigmen. **Nilai Rf** merupakan *perbandingan jarak rambat maksimum tiap kelompok pigmen terhadap jarak rambat dari titik totolan hingga garis batas atas yang telah ditetapkan*.
6. Masukkan data dalam tabel

Daun	Kelompok pigmen	Warna pigmen
A	1	.....
	2	.....
	3	.....
	N	.....
B	1	.....
	2	.....
	3	.....
	N	.....

## Pertanyaan Diskusi

1. Berapa macam kelompok pigmen yang dapat ditemukan pada daun ?
2. Apakah macam kelompok pigment antar daun berbeda ?
3. Bagaimana nilai Rf antar kelompok pigmen dan apa artinya bila berbeda ?
4. Apa yang dapat saudara simpulkan dari hasil pengamatan ini ?

## Kegiatan 2

**Topik** : Pengukuran klorofil

**Tujuan** : Mengetahui kandungan klorofil daun

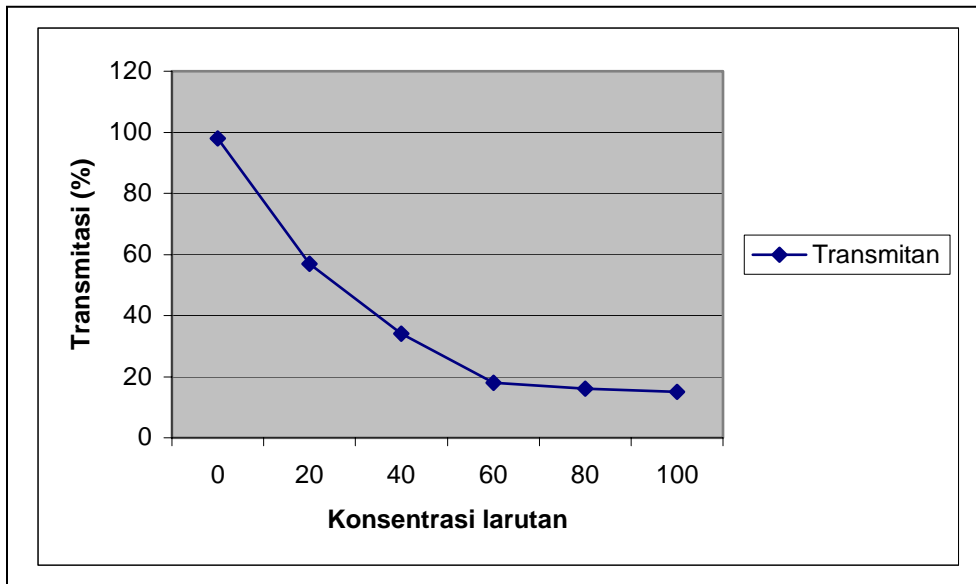
**Metode** :olorimetri dengan Spektrofotometer UV

### Prinsip Dasar

- Larutan yang berwarna akan menyerap panjang gelombang sinar tertentu. Setiap larutan akan menyerap panjang gelombang tertentu secara maksimal.
- Angka serapan terbesar untuk panjang gelombang tertentu menggambarkan panjang gelombang yang paling sesuai untuk larutan tersebut. Angka ini akan tergantung dari jenis zat terlarut dan pelarutnya.
- Semakin banyak zat terlarut akan menyerap panjang gelombang tertentu lebih besar. Dengan demikian perbedaan serapan sinar menunjukkan intensitas zat terlarut yang diukur. Ada hubungan antara penyerapan sinar atau panjang gelombang tertentu dengan konsentrasi larutan. Besarnya sinar diserap larutan disebut "*Optical density* (OD) atau nilai *Absorbansi*
- Sebagian sinar yang tidak terserap merupakan sinar yang dilewatkan (transmit), disebut nilai *transmitan*. Biasanya dinyatakan dalam persentase (%).

$$T = \frac{I_s}{I_o}$$

- Gambaran grafik hubungan antara konsentrasi larutan dengan transmitansi tampak pada grafik di bawah ini



- Nilai absorbansi merupakan negatif dari log transmitansinya

$$\text{OD [A]} = - \log T$$

Nilai A (absorbansi) atau “Optical density” memiliki hubungan linier dengan konstanta (k), tebal larutan yang dilalui (b) dan konsentrasi. Hubungan itu dapat dinyatakan dalam persamaan berikut :

$$A = k \cdot b \cdot c$$

Keterangan : k = konstanta  
 b = tebal larutan dilalui  
 c = konsentrasi

## **PENENTUAN KADAR KLOOROFIL**

Pengukuran kadar klorofil secara spektrofotometrik didasarkan pada hukum Lamber – Beer. Beberapa metode untuk menghitung kadar klorofil total, klorofil a dan klorofil b telah dirumuskan. Di antaranya adalah :

1. Metode Arnon (1949), menggunakan pelarut acetone 85 % dan mengukur nilai absorbansi larutan klorofil pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 663 dan 645 nm.
2. Metode Wintermans and De Mots (1965), menggunakan pelarut ethanol (ethyl alcohol) 96 % dan mengukur absorbansi (A) larutan klorofil pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 649 dan 665 nm.

## **CARA PENGUKURAN**

### **A. Penyiapan larutan klorofil**

1. Timbanglah 1 gram daun lalu diekstrak (digerus dengan cawan porselin) dengan sedikit pelarut acetone 85 % atau ethanol 96 %, tergantung metode yang digunakan.
2. Saring dan ambil filtratnya

#### **Catatan :**

- 1) Untuk mempercepat pengambilan filtrat, dapat dipusingkan dengan *centrifuge* sekitar 1200 rpm (putaran / mnt)
  - 2) Bila disaring, perlu dibantu dengan saringan Buchner dan disedot dengan pompa vacum
  - 3) Pelarutan klorofil juga dapat dipanaskan dalam water bath 70° C sampai klorofillarut sempurna.
3. Masukkan filtrat ke labu takar 100 ml. Kemudian tambahkan dengan pelarut yang sama sehingga larutan menjadi 100 ml.

### **B. Kalibrasi Transmittan**

Untuk mengukur klorofil, terlebih dahulu dilakukan dikalibrasi terhadap nilai transmittansinya. Nilai transmittan pelarutnya harus dibuat atau diatur 100%, sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan saat pengukuran semata-mata ditentukan oleh klorofil sebagai zat terlarutnya (bukan oleh pelarut).

**Langkah-langkahnya :**

1. Hidupkan spektrofotometer sebelum digunakan untuk mengukur (lk 20 menit) agar alatnya stabil.
2. Tuangkan pelarut (aseton / ethanol : sesuai yang digunakan) ke dalam cuvet sampai garis batas
3. Bersihkan dan keringkan permukaan luar tabung cuvet
4. Atur panjang gelombang pengukuran pada spektrofotometer.
5. Maukan cuvet ke spektrofotometer
6. Atur atau buatlah nilai “transmittan” menjadi 100 %, dengan memutar tombol pengatur sinarnya.

### C. Pengukuran klorofil

1. Tuangkan larutan klorofil ke CUVET sampai garis batas
2. Bersihkan permukaan CUVET dengan tissue, dan masukkan ke spektro-fotometer.
3. Catat nilai absorbansi (A = OD) untuk setiap panjang gelombangnya

#### *Organisasi Data*

Sampel ke	Pengukuran ke (Ulangan ukuran)	Absorbansi		Kandungan klorofil
		$\lambda$ -1	$\lambda$ -2	
I.	1	....	....	....
	2	....	....	....
	3	....	....	....
Rerata		....	....	....
II.	1	....	....	....
	2	....	....	....
	3	....	....	....
			....	....

Catatan : Lakukan pengukuran absorbansi masing-masing filtrat dengan spektrofotometer UV sesuai metode / pelarut yang digunakan

= Dengan acetone : 645 dan 663 nm

= Dengan ethanol : 649 dan 665 nm

### D. RUMUS MENGHITUNG KLOORIFIL

- a. Pelarut ethanol 96 % (Wintermans & de Mots: 1965)

Klo. a = 13,7 D-665 - 5,76 D-649 (mg/ l)  
 Klo. b = 25,8 D-649 - 7,60 D-665 (mg/ l)  
 Total klorofil = 20,0 D-649 + 6,10 D-665 (mg/ l)

**b. Pelarut aceton 80 % (Arnon : 1949)**

Klo. a = 12,7 D-663 - 2,69 D-645 (mg/ l)  
 Klo. b = 22,9 D-645 - 4,68 D-663 (mg/ l)  
 Klo. Total = 20,2 D-645 + 8,02 D-663 (MG/l)

**Tabel : kandungan klorofil daun beberapa jenis tumbuhan**

Sampel ke	Kandungan klorofil		Total klorofil
	Klorofil a	Klorofil b	
1	.....	.....	.....
2	.....	.....	.....
.			
n			

**Daftar Pustaka**

1. Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia. Penerbit ITB Bandung
2. Ross, Cleon W. - . Plant Physiology Laboratory Manual. Wadsworth Publ. Comp, Inc. Belmont, California