

MODUL PENGAYAAN MATERI  
PROJEK PENDAMPINGAN SMA

MATERI PRAKTIKUM :  
KLOOROFIL / PIGMEN FOTOSINTESIS



OLEH :  
**DRS. SUYITNO AL. MS.**

**JURUSAN PENDIDIKAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA,  
2008**



## TUJUAN

**Setelah melakukan kegiatan praktikum ini, diharapkan siswa dapat :**

1. Mendeteksi macam pigmen fotosintesis pada daun secara kualitatif dengan kromatografi kertas
2. Mendeteksi bagian daun yang aktif berfotosintesis pada daun yang memiliki aneka warna dengan uji Iodine (Uji Sach)
3. Mengukur kandungan klorofil daun dengan spektrofotometer

# DETERMINASI MACAM PIGMEN DAN KANDUNGAN KLOROFIL DAUN

## A. PENGANTAR

Semua tumbuhan mampu berfotosintesis karena memiliki seperangkat pigmen fotosintesis yang dibutuhkan. Salah satu jenis pigmen sangat penting pada perangkat fotosintesis adalah klorofil. Dalam kenyataan yang dapat kita lihat, terdapat perbedaan intensitas warna daun baik pada antar jenis tumbuhan maupun umur daun. Pada jenis-jenis tumbuhan tertentu bahkan memiliki daun beraneka warna.

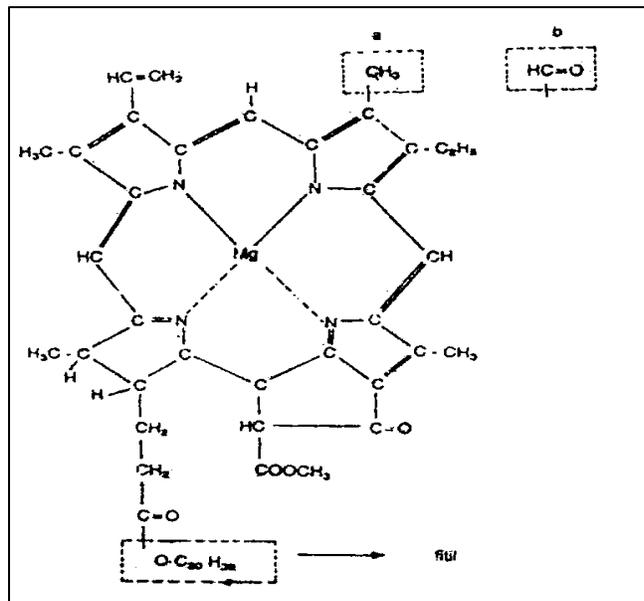
Pertanyaan menggelitik dan menarik di antaranya adalah “apakah pada daun yang memiliki aneka warna, fotosintesisnya berlangsung di semua bagian daun tersebut ? Apakah pada daun albino (daun putih atau belang putih) juga berfotosintesis ?. Adakah cara sederhana untuk mendeteksi adanya aneka macam pigmen daun ?

## B. TINJAUAN TEORI

### 1. Klorofil

Klorofil adalah pigmen hijau yang ada dalam kloroplastida. Pada umumnya klorofil terdapat pada kloroplas sel-sel mesofil daun, yaitu pada sel-sel parenkim palisade dan atau parenkim bunga karang. Dalam kloroplas, klorofil terdapat pada membran thylakoid grana. Pada tumbuhan tingkat tinggi terdapat dua jenis klorofil yaitu **klorofil-a** dan **klorofil-b**. Pada keadaan normal, proporsi klorofil-a jauh lebih banyak daripada klorofil-b. Selain klorofil, pada membran thylakoid juga terdapat pigmen-pigmen lain, baik yang berupa turunan-turunan klorofil-a maupun pigmen lainnya. Kumpulan bermacam-macam pigmen fotosintesis disebut **fotosintem**, berperan menjerap energi cahaya (foton, kuantum) pada reaksi terang untuk menghasilkan energi kimia berupa ATP dan NADPH<sub>2</sub>. Contoh turunan klorofil-a yang berperan penting pada fotosintesis adalah **feofitin** (klorofil-a yang kehilangan inti Mg, menjadi salah satu komponen fotosintem II), pigmen yang peka terhadap  $\lambda$  680 nm (**P680** = sebagai pusat reaksi fotosistem II), dan **P700** (menjadi pusat reaksi fotosistem I). Pigmen yang lain antara lain **carotenoida** dan **Xantofil**.

Molekul klorofil tersusun atas 4 cincin pirol dengan Mg sebagai inti. Pada klorofil terdapat rangkaian yang disebut fitil ( $C_{20}H_{39}O$ ) yang jika terkena air dengan pengaruh enzim klorofilase akan berubah menjadi fitol ( $C_{20}H_{39}OH$ ). Fitol adalah alkohol primer jenuh yang mempunyai daya afinitas yang kuat terhadap  $O_2$  dalam proses reduksi klorofil.



**Gambar : Struktur Klorofil**

Sifat fisik klorofil adalah menerima dan atau memantulkannya dalam gelombang yang berlainan (berpendar = berfluorescens). Klorofil banyak menyerap sinar dengan panjang gelombang antara 400-700 nm, terutama sinar merah dan biru. Sifat kimia klorofil menurut antara lain (1) tidak larut dalam air, melainkan larut dalam pelarut organik yang lebih polar, seperti etanol dan kloroform, (2) inti Mg akan tergeser oleh 2 atom H bila dalam suasana asam, sehingga membentuk suatu persenyawaan yang disebut *feofitin* yang berwarna *coklat*.

Perkembangan kloroplas secara fungsional berasal dari proplastida yang ada pada kecambah. Seiring dengan berkembangnya daun pada kecambah, **proplastida** berkembang menjadi **etioplas** yang khas dengan badan **prolamelar**-nya. Oleh adanya cahaya yang cukup, badan prolamelar akan membentuk tilakoid dari kloroplas fungsional. Sintesis klorofil pada Angiospermae tergantung pada cahaya. Prekursor untuk

sintesis klorofil adalah **protoklorofilid** yang disintesis dari **protoporfirin IX** oleh magnesium menjadi cincin **porfirin**. Protoklorofilid diubah menjadi klorofilid a kemudian berkembang menjadi klorofil a melalui proses fitilasi (dengan penambahan fitil). Bila klorofil a teroksidasi maka akan menjadi klorofil b.

## 2. Determinasi Pigmen

Pigmen daun dapat dideterminasi secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, macam pigmen daun dapat dideteksi dengan metode **kromatografi**. Ada beberapa macam teknik kromatografi, dari teknik yang sederhana sampai teknik modern. Teknik sederhana dapat dilakukan dengan *Kromatografi Kertas* (KKt) dengan menggunakan kertas Watmann 3. Kromatografi yang lebih maju dengan *Kromatografi Lapis Tipis* (KLT), yaitu dengan silika gel pada pelat alumenium/ plastik. Untuk zat yang mudah menguap dilakukan dengan teknik *Kromatografi Gas*. Teknik lain adalah dengan *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*.

Deteksi cara sederhana terhadap macam pigmen daun dengan teknik kromatografi kertas pada dasarnya melakukan pemisahan zat dengan menggunakan larutan pengembang (**eluen**) yaitu *campuran pelarut organik dengan perbandingan tertentu yang sesuai sesuai* sifat zat dalam ekstrak pigmen daun yang hendak dipisahkan. Setelah ekstrak pigmen daun yang ditotolkan pada kertas Watmann 3 dicelupkan dalam larutan pengembang dalam bejana tertutup yang jenuh uap larutan pengembang, zat yang paling larut akan merambat dengan lebih cepat pada kertas Watmann, begitu pula sebaliknya. Karena itu akan diperoleh jarak rambat golongan zat yang satu dengan golongan zat lain yang berbeda tingkat kelarutannya dalam larutan pengembang. Sebagian jenis pigmen tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Karena itu kadang membutuhkan alat bantu berupa penyemprot bercak supaya memberikan reaksi warna tertentu, dan kadang hanya akan terlihat di bawah sinar UV.

## 3. Pengukuran klorofil

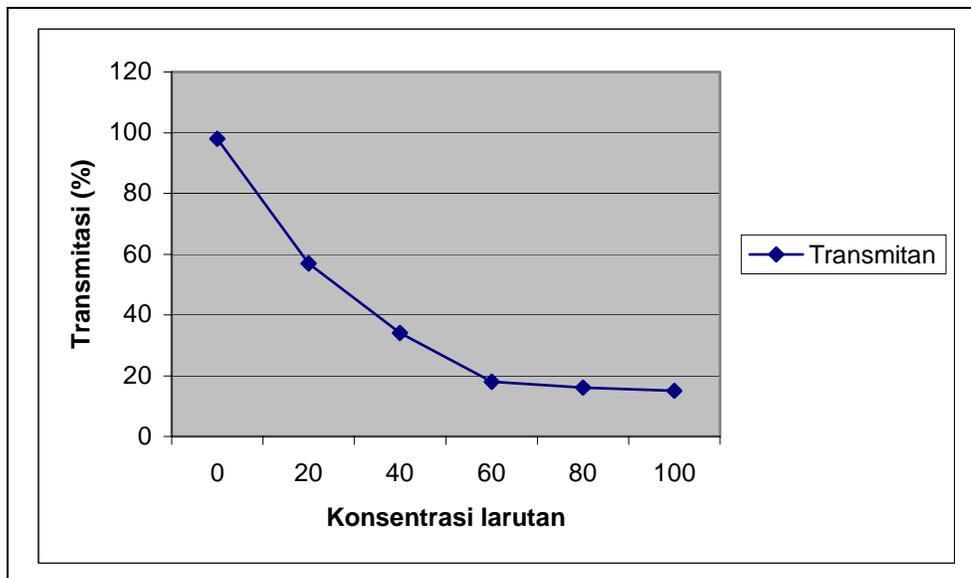
### a. Prinsip dasar

- 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 persen (%).

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

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



- Nilai absorbansi merupakan negatif dari log transmitansinya

$$OD [A] = - \log T$$

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

### **b. Metode Pengukuran**

Metode penentuan klorofil adalah dengan teknik Spektroskopi dengan spektrofotometer UV. Pengukuran kadar klorofil secara spektrofotometrik didasarkan pada hukum Lambert – 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.

## **KEGIATAN 1**

**Topik** : **Determinasi Pigmen Daun**

**Tujuan** : Untuk mengidentifikasi macam pigmen pada bagian-bagian daun yang berbeda warna

## **Prinsip Dasar determinasi pigmen**

- 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.

## **Alat dan Bahan**

Alat : Tabung Jar dan penutupnya, kertas Whatman 3, alat penotol ekstrak, tabung reaksi dan rak tabungnya, pipet, cawan porselin dan penggerusnya, water bath.

Bahan : Daun yang memiliki aneka warna 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.

- 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 totalan hingga garis batas atas yang telah ditetapkan*.
- Masukkan data dalam Tabel berikut :

Tabel : Tabulasi hasil pengamatan warna

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

### Pertanyaan Diskusi

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

### KEGIAAN 2

**A. TOPIK** : Bagaimana Kandungan Klorofil pada Bagian-Bagian Daun yang Berbeda Warna ?

**B. Tujuan** : Untuk mengetahui kandungan klorofil pada bagian-bagian daun yang berbeda warna

### C. ALAT dan BAHAN

N0	Macam alat / bahan	N0	Macam alat/ bahan
----	--------------------	----	-------------------

1	Gunting (cawan porselin)	7	2 buah gelas beker 100ml,
2	Tabung reaksi + rak tabung	8	Cuvet spektrometer
3	Water bath	9	Nampan plastik kecil
4	Pemusing / centrifuge	10	Ethanol 96 % / aceton 80 %
5	3 labu takar, 50ml,	11	Kertas tissue
6	Timbangan		

#### D. CARA KERJA

##### 1. Penyiapan larutan klorofil

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

##### Catatan :

- 1) Untuk mempercepat pengambilan filtrat, dapat dipusingkan dengan *centrifuge* sekitar 1500 - 2000 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 klorofil larut sempurna, perlu dikalibrasi dengan prosedur standar ( digerus).
- c. Masukkan filtrat ke labu takar 100 ml. Kemudian tambahkan dengan pelarut yang sama sehingga larutan menjadi 100 ml.

##### 2. Kalibrasi Transmittansi

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

##### 3. Pengukuran Absorbansi (OD)

Hidupkan spektrofotometer sebelum digunakan untuk mengukur (lk 20 menit) agar alatnya stabil.

1. Tuangkan pelarut (acetone / ethanol : sesuai yang digunakan) ke dalam cuvet sampai garis batas
2. Bersihkan dan keringkan permukaan luar tabung cuvet
3. Atur panjang gelombang pengukuran pada spektrofotometer.
4. Masukkan cuvet ke spektrofotometer
5. Atur atau buatlah nilai "transmittan" menjadi 100 %, dengan memutar tombol pengatur sinarnya.

#### 4. Pengukuran klorofil

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

##### *Organisasi Data*

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

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

#### 5. RUMUS MENGHITUNG KLOROFIL

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

$$\text{Klo. a} = 13,7 D-665 - 5,76 D-649 \text{ (mg/ l)}$$

$$\text{Klo. b} = 25,8 D-649 - 7,60 D-665 \text{ (mg/ l)}$$

$$\text{Total klorofil} = 20,0 D-649 + 6,10 D-665 \text{ (mg/ l)}$$

##### b. Pelarut acetone 80 % (Arnon : 1949)

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

N0	Sampel	Kandungan klorofil		Total klorofil
		Klorofil a	Klorofil b	
1	Daun A	.....	.....	.....
2	Daun B	.....	.....	.....
N	....			

**Pertanyaan :**

1. Jenis klorofil manakah yang lebih besar ?
2. Apakah ada perbedaan kandungan klorofil pada antar daun atau antar bagian daun ?
3. Bagian daun manakah yang klorofilnya tinggi ?
4. Cari informasi untuk memperoleh jawaban mengapa gejalanya demikian ?
5. Kesimpulan apakah yang saudara dapatkan ?

**Kegiatan 3**

**Topik** : Bagian daun manakah yang aktif berfotosintesis pada daun yang memiliki aneka warna ?

**Tujuan** : Untuk mendeteksi bagian daun manakah yang aktif berfotosintesis ?

**Prinsip Dasar**

- Fotosintesis membutuhkan cahaya yang cukup
- Fotosintesis merupakan proses sintesis karbohidrat dari H<sub>2</sub>O dan CO<sub>2</sub> dengan bantuan energi matahari yang berlangsung pada jaringan fotosintetik

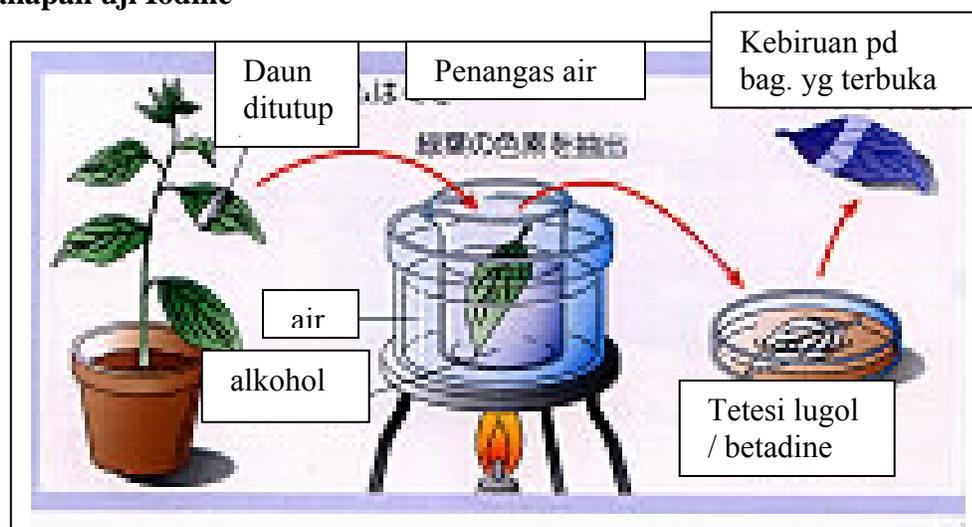
- Laju fotosintesis dapat diukur dari volume CO<sub>2</sub> dikonsumsi atau dari O<sub>2</sub> yang dilepaskan.
- Hasil fotosintesis dapat dideteksi dari terbentuk tidaknya amilum, yang dapat dideteksi dengan uji Iodine seperti percobaan Sach (Uji Sach)

- Alat dan Bahan :**
1. Tanaman sehat
  2. Kertas grenjeng / aluminium foil dan klip
  3. Kompor / pemanas air
  4. Ethanol 96 % dan air
  5. Gelas beker besar (1000 ml) besar dan kecil (500 ml)
  6. Valet dan pipet tetes
  7. Larutan lugol / Iodine / obat merah
  8. Larutan amilum 1 %

**Cara Kerja :**

1. Petiklah daun tanaman beraneka warna yang terkena cukup cahaya
2. Celupkan segera daun tersebut ke air mendidik
3. Pindahkan daun ke larutan ethanol panas, biarkan sampai pigmen daunnya melarut hingga daun menjadi putih
4. Ambillah daun dan tempatkan ke cawan petri
5. Tetesilah daun dengan larutan Iodine yang masih bagus
6. Amati reaksi warna berbagai bagian daun yang berbeda warna tersebut

**Skema tahapan uji Iodine**



**Pertanyaan :**

1. Pada bagian daun manakah pada daun beraneka warna terdapat amilum lebih banyak ?
2. Pada bagian daun mana sajakah terdeteksi adanya amilum menurut uji Iodine yang anda lakukan ?
3. Diskusikan mengapa gejala yang muncul demikian ?
4. Apakah gejala tersebut terkait dengan komposisi pigmen daunnya ?
5. Kesimpulan apakah yang dapat anda nyatakan dari percobaan ini ?

**DAFTAR PUSTAKA**

Campbell, Neil A.; Jane B. Reece and Lawrence G. Mitchell. 1999. **Biology**. Addison-Wesley, Inc. California

Edwards, Gerry and David Walker. 1983. **C3, C4 : Mechanisms and cellular and environmental regulation, of photosynthesis**. Blackwell Sci. Publ. Melbourne.

Harborne, J.B. 1987. **Metode Fitokimia**. Penerbit ITB Bandung

Ross, Cleon W. - . **Plant Physiology Laboratory Manual**. Wadsworth Publ. Comp, Inc. Belmont, California

Raven, Peter H.; Ray F. Evert and Susan E. Eichhorn. **Biology of Plants**. 3<sup>rd</sup> Ed. Worth

Publisher. USA

Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1985. **Plant Physiology**. Wadsworth Publ.Comp. Inc. USA

Taiz, Lincoln and Eduardo Zeiger. 1991. **Plant Physiology**. The Benjamin/ Cummings  
Publ.Comp.Inc. California