



[www.esaunggul.ac.id](http://www.esaunggul.ac.id)

# **INTRUMENTASI BIOTEKNOLOGI**

## **Program Studi Bioteknologi**

Oleh: Seprianto, S.Pi, M.Si

## Meeting 11

# Spektrofotometer dan pH Meter

# Tujuan Perkuliahan

- Mahasiswa dapat mengidentifikasi dan mengetahui prinsip bekerjanya peralatan umum Bioteknologi: UV Vis Spektrofotometer dan spektrofluorometer, PH meter



# Spectrophotometer



# Spektrofotometer

- **Spektrum** : rentetan warna kontinu yang diperoleh apabila cahaya diuraikan ke dalam komponennya
- **Foto** : partikel elementer dalam fenomena elektromagnetik Biasanya foton dianggap sebagai pembawa radiasi elektromagnetik, seperti cahaya, gelombang radio, dan Sinar-X.
- **Meter** : Pengukuran



# Spektrofotometer

- Spektrofotometer → spektrometer + fotometer
- Spektrometer → menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu
- Fotometer → alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsikan
- Spektrofotometer → untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan.

# Spektrometri

Berdasarkan jenis materi yang berinteraksi dengan radiasi elektromagnetik, dibagi :

❑ Spektrometri molekul → radiasi elektromagnetik berinteraksi dengan molekul

Contoh : NMR, IR, UV-Vis, XRD

❑ Spektrometri atom → radiasi elektromagnetik berinteraksi dengan atom

Contoh : AAS, AFS

# Spektrofotometri

- Analisis spektrofotometri : analisis kimia yang didasarkan pada pengukuran intensitas warna larutan yang akan ditentukan konsentrasinya dibandingkan dengan larutan standar, yaitu larutan yang telah diketahui konsentrasinya.
- Penentuan konsentrasi didasarkan pada absorpsimetri, yaitu metode analisis kimia yang didasarkan pada pengukuran absorpsi (serapan) radiasi gelombang elektromagnetik.



# Spektrofotometri

- Spektrofotometri adalah pengukuran konsentrasi larutan dengan menggunakan instrumen
- Spektrofotometer : instrumen yang digunakan untuk mengukur jumlah cahaya yang diserap atau intensitas warna yang sesuai dengan panjang gelombang
- Pengukuran kuantitatif dari cahaya yang diserap terukur dalam bentuk Transmittansi dan absorbansi tersebut.

# Prinsip Spektrometri

- Larutan sampel dikenai radiasi elektromagnetik, sehingga menyerap energi / radiasi → terjadi interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan materi (atom/molekul)
- Jumlah intensitas radiasi yang diserap oleh larutan sampel dikonversi dengan konsentrasi analit → data kuantitatif

$\nu$  = Wave Number ( $\text{cm}^{-1}$ )

# Radiasi Elektromagnetik

$\lambda$  = panjang gelombang ( $\text{nm}^{-1}$ )

$c$  = kecepatan cahaya =  $3 \times 10^{10}$  cm/sec.

$\nu$  = frekuensi (Hz)

$$\nu = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$$

Energi foton :

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad \nu = \frac{c}{\lambda} \quad c = \nu\lambda$$

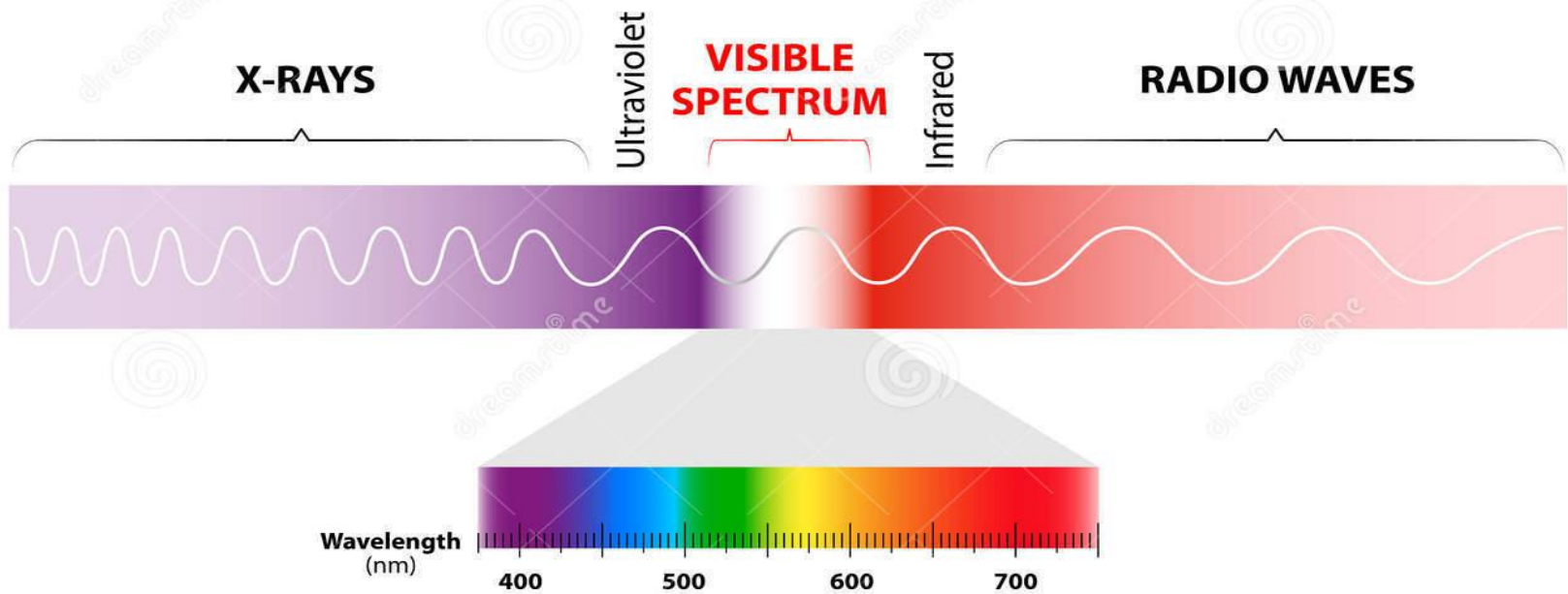
$h$  (Tetapan Planck) =  $6.62 \times 10^{-27}$  (Erg $\times$ sec)

# Sifat spektra, aplikasi dan interaksi radiasi elektromagnetik

Energy		Wave Number $\nu$	Wavelength $\lambda$	Frequenc $\nu$	Type Radiation	Type spectroscopy	Type Quantum Transition
Kcal/mol	eV	$\text{cm}^{-1}$	cm	Hz			
$9.4 \times 10^7$	$4.9 \times 10^6$	$3.3 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{-11}$	$10^{21}$	Gamma ray	Gamma ray emission	Nuclear
$9.4 \times 10^3$	$4.9 \times 10^2$	$3.3 \times 10^6$	$3 \times 10^{-7}$	$10^{17}$	X-ray	X-ray absorption, emission	Electronic (inner shell)
$9.4 \times 10^1$	$4.9 \times 10^0$	$3.3 \times 10^4$	$3 \times 10^{-5}$	$10^{15}$	Ultra violet	UV absorption	Electronic (outer shell)
$9.4 \times 10^{-1}$	$4.9 \times 10^{-2}$	$3.3 \times 10^2$	$3 \times 10^{-3}$	$10^{13}$	Infrared	IR absorption	Molecular vibration
$9.4 \times 10^{-3}$	$4.9 \times 10^{-4}$	$3.3 \times 10^0$	$3 \times 10^{-1}$	$10^{11}$	Micro-wave	Microwave absorption	Molecular rotation
$9.4 \times 10^{-7}$	$4.9 \times 10^{-8}$	$3.3 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^3$	$10^7$	Radio	Nuclear magnetic resonance	Magnetically induced spin states

# Spektrofotometer UV Vis

## VISIBLE AND INVISIBLE LIGHT



Download from  
**Dreamstime.com**

This watermarked comp image is for previewing purposes only.

ID 36314824

© Designua | Dreamstime.com



warna yang teramati	Warna yang diserap	Panjang gelombang
Green	Red	700 nm
Blue-green	Orange-red	600 nm
Violet	Yellow	550 nm
Red-violet	Yellow-green	530 nm
Red	Green	500 nm
Orange	Blue	450 nm
Yellow	Violet	400 nm

# Spektrum Elektromagnetik

<u>Type Radiasi</u>	<u>Frekuensi (Hz)</u>	<u>Panjang Gelombang</u>
gamma-rays	$10^{20}$ - $10^{24}$	<1 pm
X-rays	$10^{17}$ - $10^{20}$	1 nm-1 pm
ultraviolet	$10^{15}$ - $10^{17}$	400 nm-1 nm
<b>visible</b>	<b><math>4</math>-<math>7.5 \times 10^{14}</math></b>	<b>750 nm-400 nm</b>
near-infrared	$1 \times 10^{14}$ - $4 \times 10^{14}$	2.5 $\mu$ m-750 nm
infrared	$10^{13}$ - $10^{14}$	25 $\mu$ m-2.5 $\mu$ m
microwaves	$3 \times 10^{11}$ - $10^{13}$	1 mm-25 $\mu$ m
radio waves	< $3 \times 10^{11}$	>1 mm

# Komponen

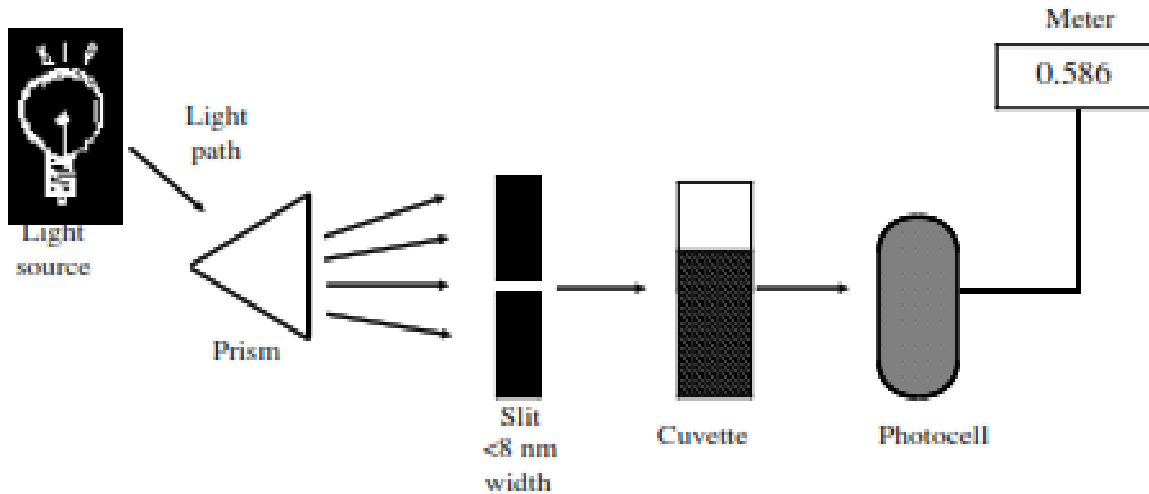


Figure 3. Components of a spectrophotometer.

Ada hubungan antara absorbance dan Concentration

# Dasar pengukuran Spektrofotometer

**Hukum Lambert Beer** – hubungan linear antara absorbansi dengan konsentrasi zat yang diserap

$$A = abc$$

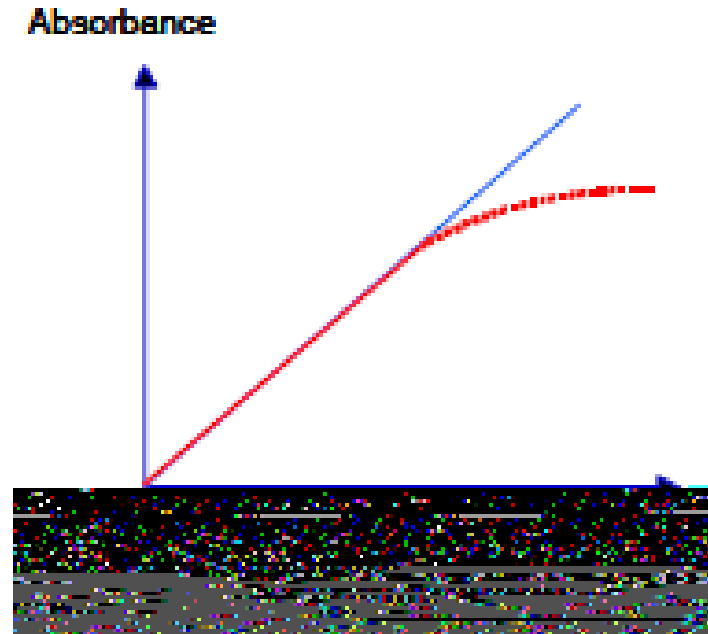
**A** : absorbance

“**a**” is **molar absorptivity** dalam  $L/[(\text{mole})(\text{cm})]$

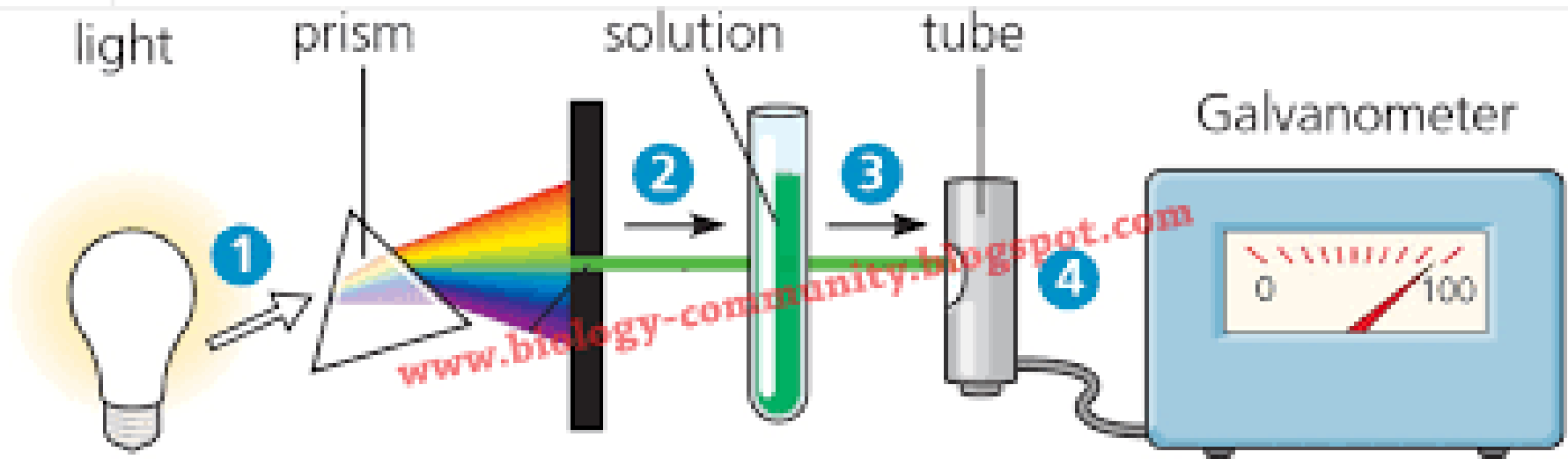
“**b**” : **panjang kuvet** dalam cm

Diameter kuvet atau tempat sampel = jarak cahaya yang melalui sampel yang diserap

“**c**” konsentrasi sampel dalam (mol/L)



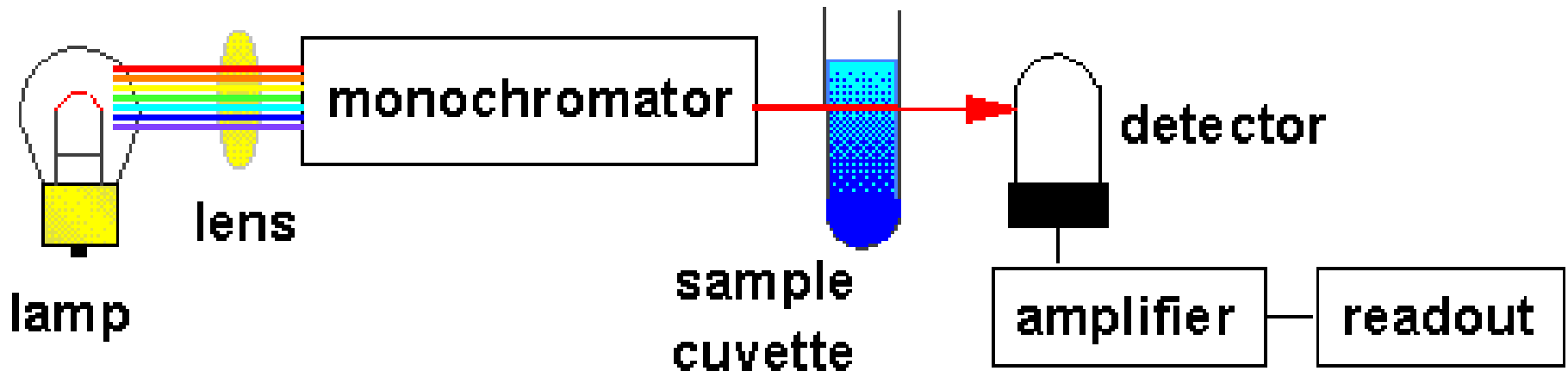
# Komponen Pendukung



**Galvanometer** adalah alat untuk menentukan kehadiran, arah, dan kekuatan dari arus listrik dalam konduktor. **Galvanometer** ditemukan oleh Hans C. Oersted. Fungsi **Galvanometer** adalah alat untuk mendeteksi dan mengukur arus listrik yang kecil.



# Spektrofotometer



- Sumber cahaya (Lampu) : memancarkan semua warna cahaya (yaitu, cahaya putih).
- Monokromator : memilih satu panjang gelombang dan panjang gelombang yang dikirimkan melalui sampel.
- Detektor : mendeteksi panjang gelombang cahaya yang telah melewati sampel.
- Amplifier : meningkatkan sinyal sehingga lebih mudah untuk baca

# Komponen : lampu

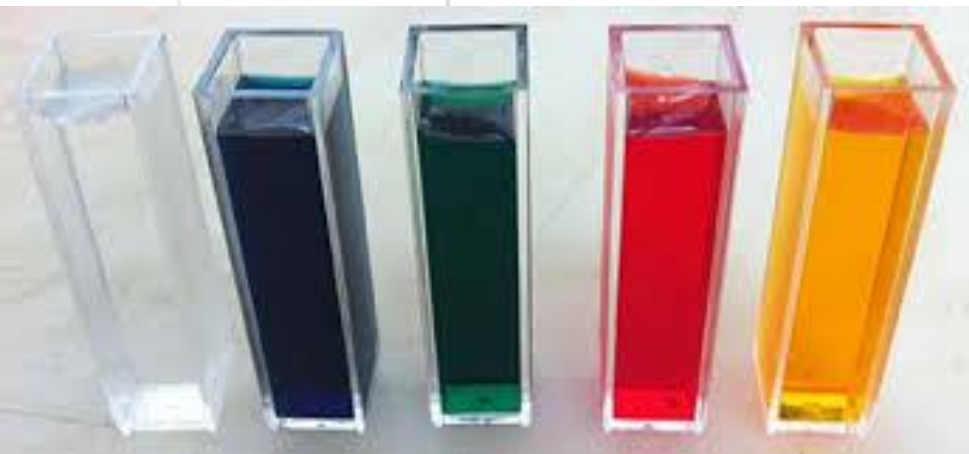
- Lampu
  - Spektrofotometer UV
    1. Lampu Gas hidrogen
    2. Lampu Merkuri
  - Spektrofotometer Visible
    - Lampu Tungsen



# Komponen : sample cells

- ❑ Sample cells (kuvet)
  - Spektrofotometer UV
    - Quartz (crystalline silica)
  - Spektrofotometer Visible
    - Glass







# Aplikasi spektrofotometer UV

Protein

Konsentrasi DNA/RNA

Amino Acids (aromatic)

Glucose Determination

Enzyme Activity (Hexokinase)



# Aplikasi

Menunjukkan kontaminasi protein dalam konsentrasi DNA

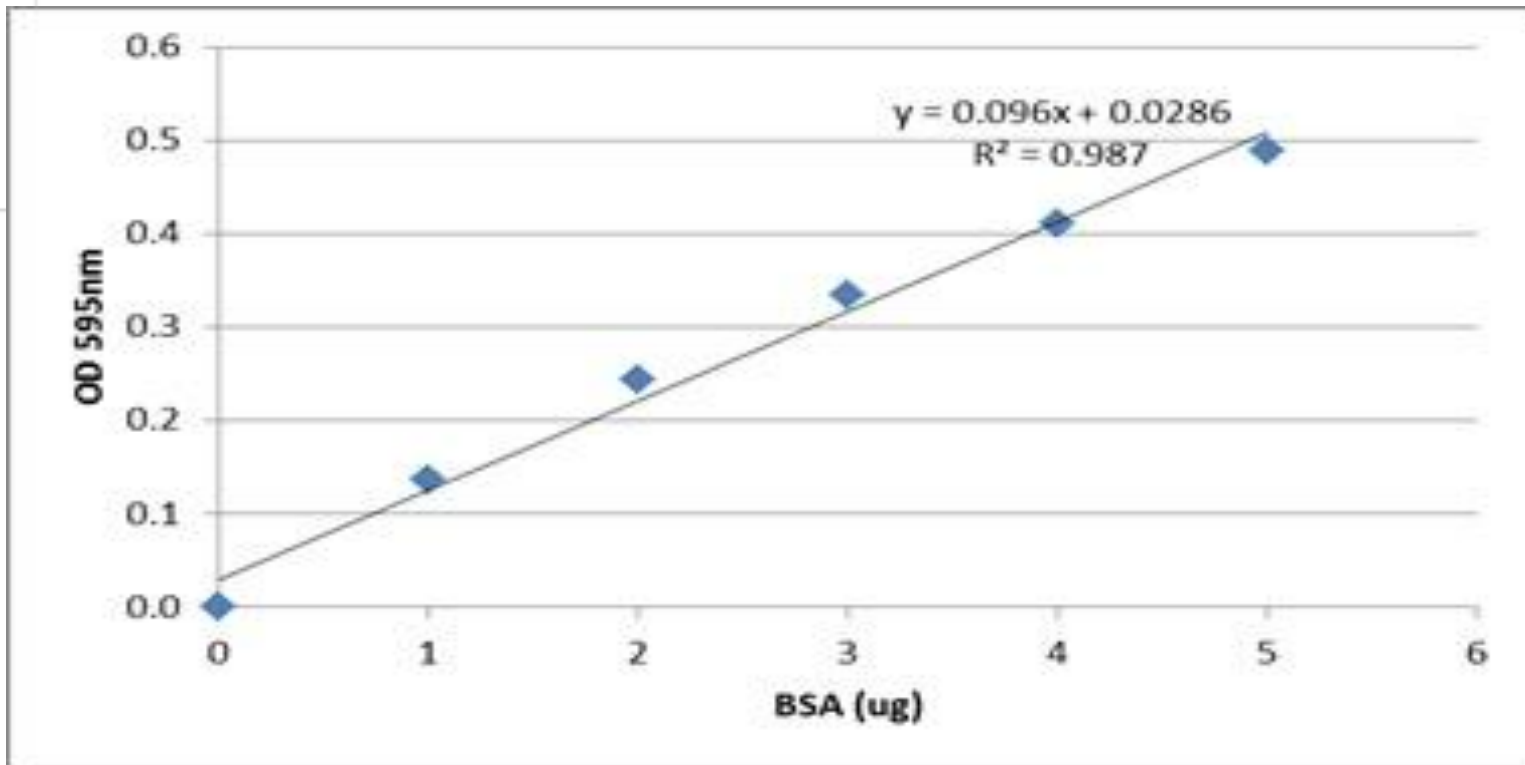
**TABLE A8-5 Absorbance of Nucleic Acids and Proteins**

% PROTEIN	% NUCLEIC ACID	OD <sub>260</sub> :OD <sub>280</sub>	% PROTEIN	% NUCLEIC ACID	OD <sub>260</sub> :OD <sub>280</sub>
100	0	0.57	45	55	1.89
95	5	1.06	40	60	1.91
90	10	1.32	35	65	1.93
85	15	1.48	30	70	1.94
80	20	1.59	25	75	1.95
75	25	1.67	20	80	1.97
70	30	1.73	15	85	1.98
65	35	1.78	10	90	1.98
60	40	1.81	5	95	1.99
55	45	1.84	0	100	2.00
50	50	1.87			

Using the predicted values in this table, Glasel (1995) derived an empirical equation to describe %N for a range of OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> ratios: %N = F([11.16R - 6.32],[2.16 - R]), where R = OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub>. Note that estimates of purity of nucleic acids based on OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> ratios are accurate only when the preparations are free of phenol. Water saturated with phenol absorbs with a characteristic peak at 270 nm and an OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> ratio of 2 (Stulnig and Amberger 1994). Nucleic acid preparations free of phenol should have OD<sub>260</sub>:OD<sub>270</sub> ratios of ~1.2.

# Interpretasi Data

Kurva Standar Protein



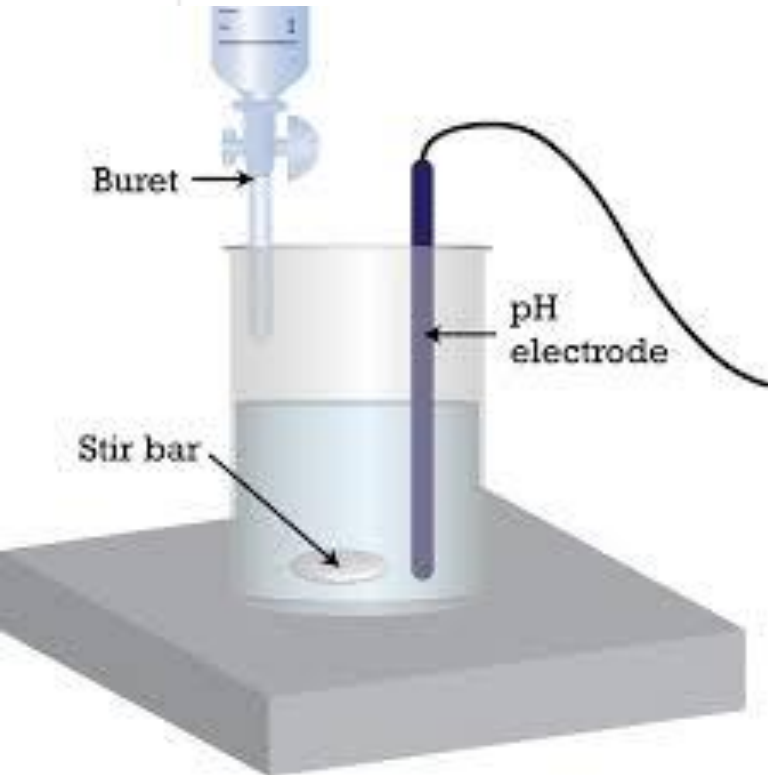


# pH Meter

- **pH meter adalah** alat elektronik yang digunakan untuk mengukur pH (keasaman atau alkalinitas) dari cairan (meskipun probe khusus terkadang digunakan untuk mengukur pH zat semi-padat).
- Sebuah pH meter khas terdiri dari probe pengukuran khusus atau elektroda yang terhubung ke meteran elektronik yang mengukur dan menampilkan pembacaan pH

# Komponen pH Meter

Elektroda adalah batang seperti struktur biasanya terbuat dari kaca. Pada bagian bawah elektroda ada bohlam, bohlam merupakan bagian sensitif dari probe yang berisi sensor





# Bagian pH Meter



- Prinsip kerja utama **pH meter** adalah terletak pada sensor probe berupa elektrode kaca (glass electrode).
- Ujung elektrode kaca adalah lapisan kaca setebal 0,1 mm yang berbentuk bulat (bulb). Bulb ini dipasangkan dengan silinder kaca non-konduktor atau plastik memanjang, yang selanjutnya diisi dengan larutan HCl (0,1 mol/dm<sup>3</sup>).
- Di dalam larutan HCl, terendam sebuah kawat elektrode panjang berbahan perak yang pada permukaannya terbentuk senyawa setimbang AgCl. Konstannya jumlah larutan HCl pada sistem ini membuat elektrode Ag/AgCl memiliki nilai potensial stabil.



# Jenis pH Meter



# Portable pH meter



# Kalibrasi pH meter

- Untuk pengukuran yang sangat presisi dan tepat, pH meter harus dikalibrasi setiap sebelum dan sesudah melakukan pengukuran. Kalibrasi harus dilakukan setidaknya dengan dua macam cairan standard buffer yang sesuai dengan rentang nilai pH yang akan diukur.
- pH kalibrasi umumnya buffer pH 4, pH 7 dan pH 10 diperbolehkan.
- pH meter memiliki pengontrol pertama (kalibrasi) untuk mengatur pembacaan pengukuran agar sama dengan nilai standard buffer pertama dan pengontrol kedua (slope) yang digunakan menyetel pembacaan meter sama dengan nilai buffer kedua. Pengontrol ketiga untuk men-set temperatur.

# Kalibrasi pH meter

Dalam penggunaan pH meter ini, Tingkat keasaman/kebasaan dari suatu zat, ditentukan berdasarkan keberadaan jumlah ion hidrogen dan ion hidroksida dalam larutan.

# Nilai pH meter

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

Konsentrasi larutan  $\text{H}^+$  dalam larutan yang menentukan derajat keasaman

$\text{pH} = \text{pOH} = 7$  : larutan netral

$\text{pH} < 7$  : asam

$\text{pH} > 7$  : basa



# Buffer pH Meter

- Kalibrasi
  - Menggunakan buffer pH 4
  - Menggunakan buffer pH 7
  - Menggunakan buffer pH 10
  - Disimpan dalam KCl atau NaCl jenuh
  - Diatur dengan menggunakan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N







**Thank  
You!!!**

[www.esaunggul.ac.id](http://www.esaunggul.ac.id)