

Ketrampilan Dasar Laboratorium

Program Studi Ilmu Biomedik 2011



Kuliah 3: September 26 2011

Teknik-teknik utk memisahkan molekul²
(*khususnya molekul protein dan asam nukleat*)

Sentrifugasi

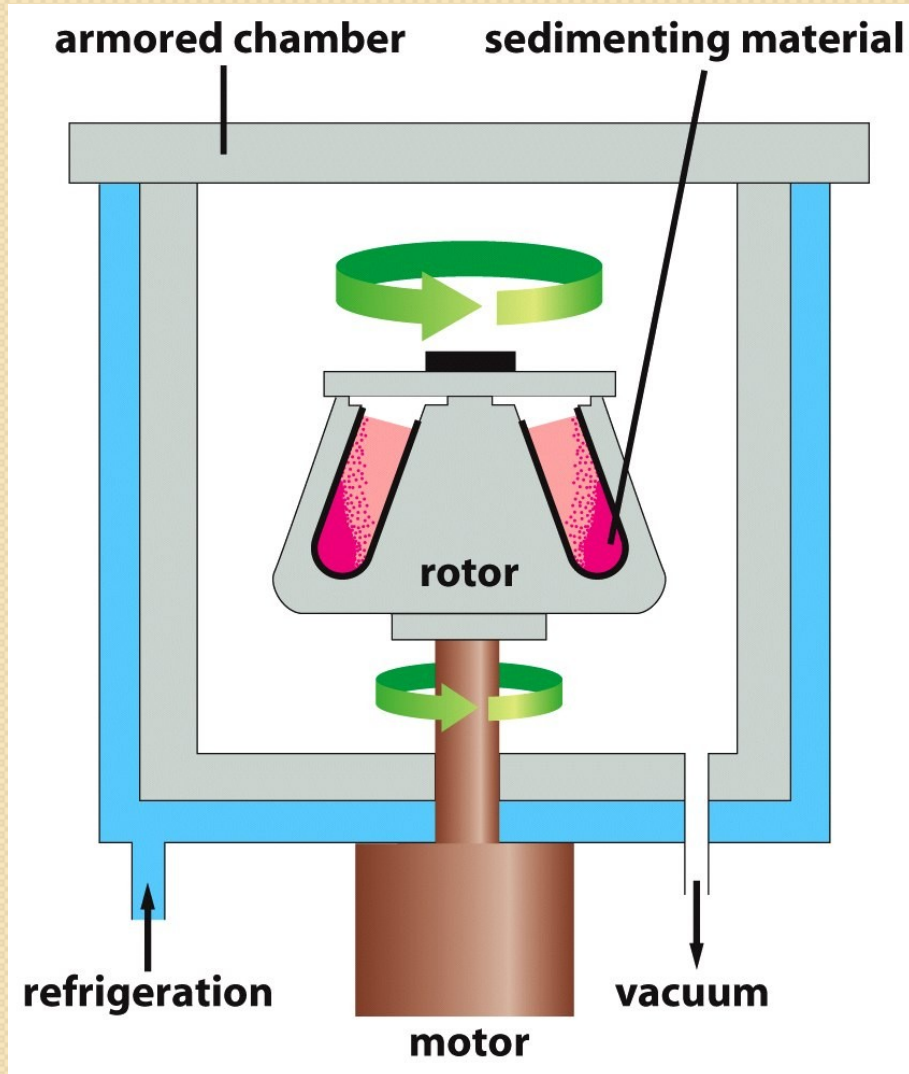
Kromatografi

Dialisis

Praktikum 3: Buffer , pH, Titrasi dan
Kromatografi

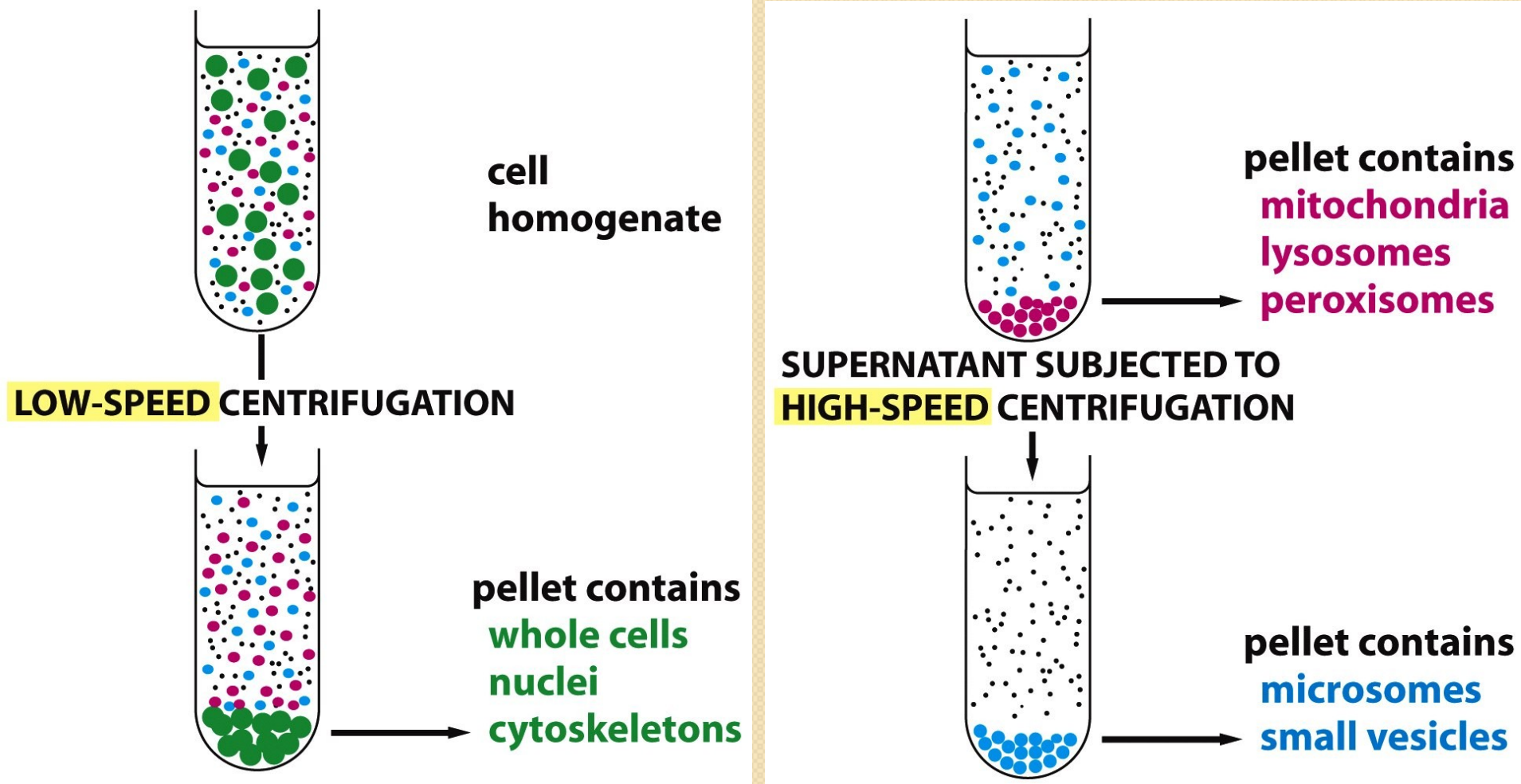
Kunci nilai tugas grafik

SENTRIFUGASI: Molekul-molekul dipisahkan berdasarkan ukuran dan beratnya

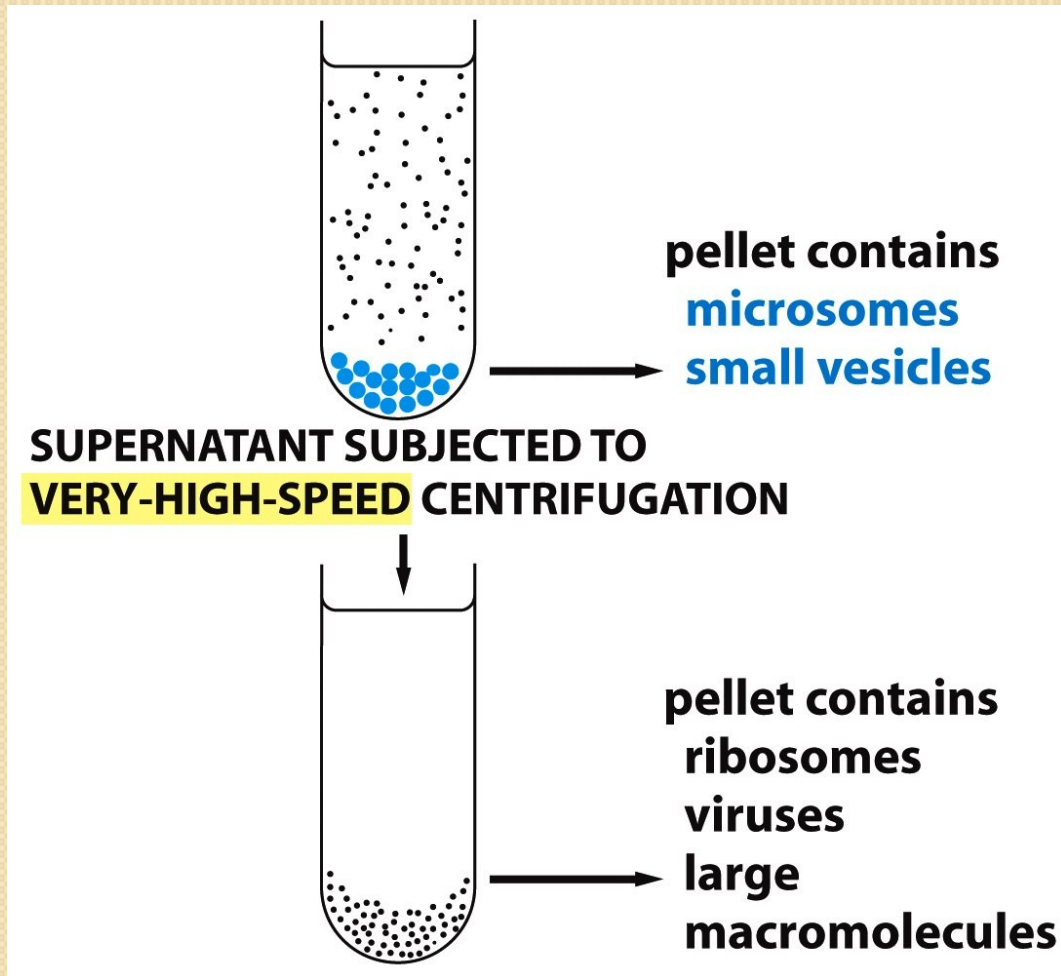


- yg berat dan besar turun ke bawah tabung sentrifugasi lebih cepat
- Prosesnya disebut "*Sedimentation*"
- alatnya harus dalam keadaan keseimbangan!!

SENTRIFUGASI



SENTRIFUGASI



sel-sel utuh/nuklei...

~ 500 g force

(low speed)

mitokondria...

~ 10.000 g force

(high speed)

vesikel kecil....

~ 100.000 g force

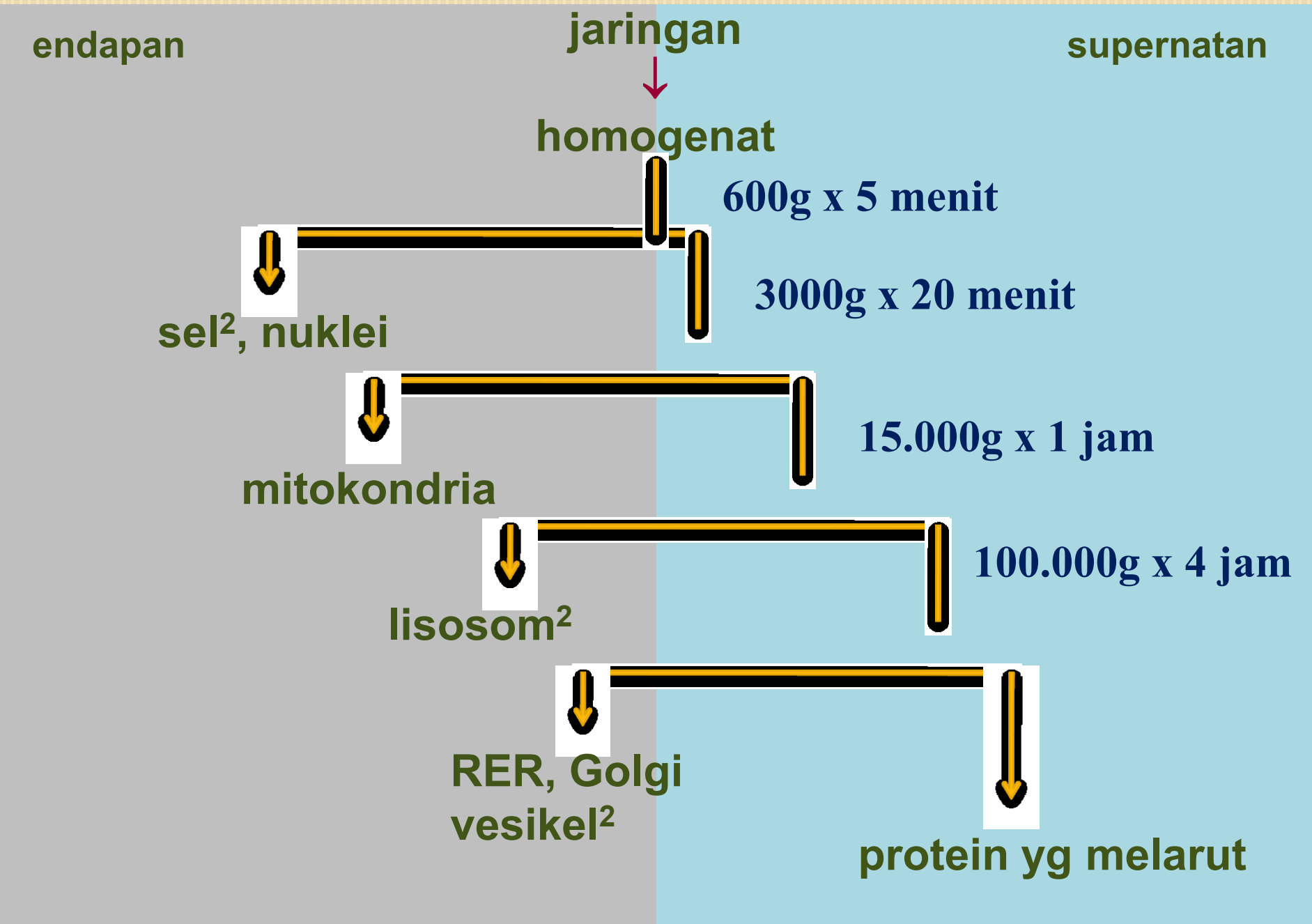
(high speed)

**ribosomes/virus²/
DNA/ protein yg
besar...**

>100.000 g force

(ultra high speed)

SENTRIFUGASI: contoh protokol



Sentrifugasi di Laboratori Terpadu



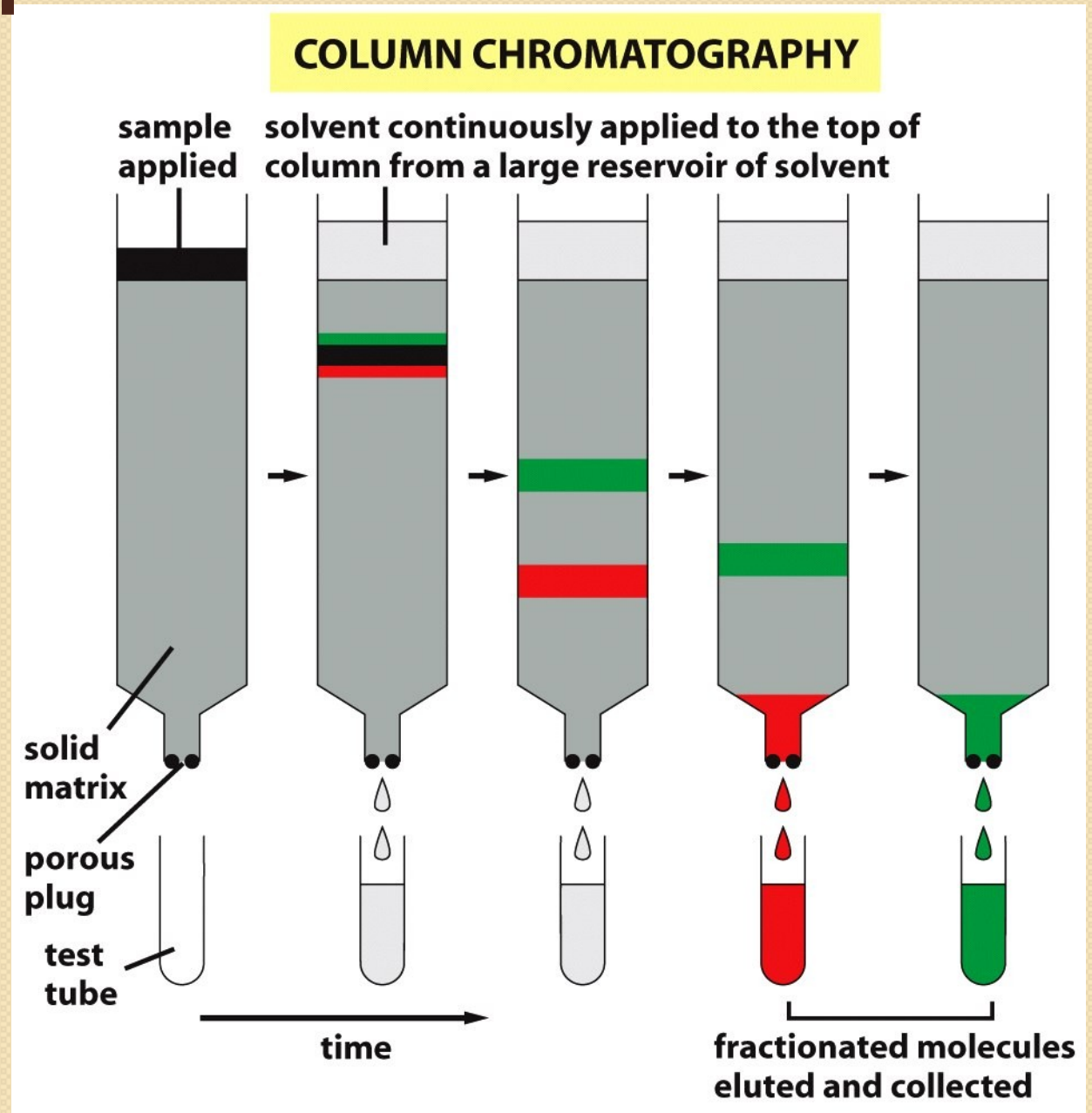
mikro sentrifuse

- *untuk sampel kecil (0,1 s/d 2,0 ml)*
- *kecepatan tercapai 14,000rpm (~15.000g)*

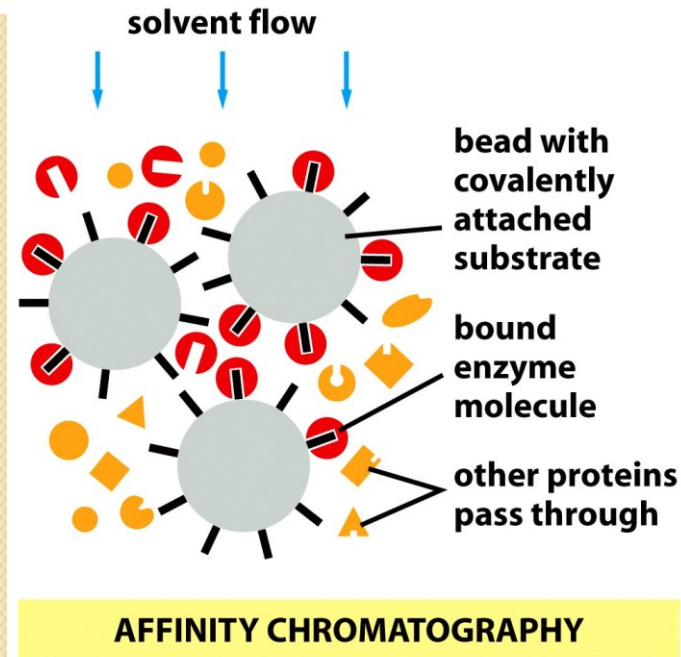
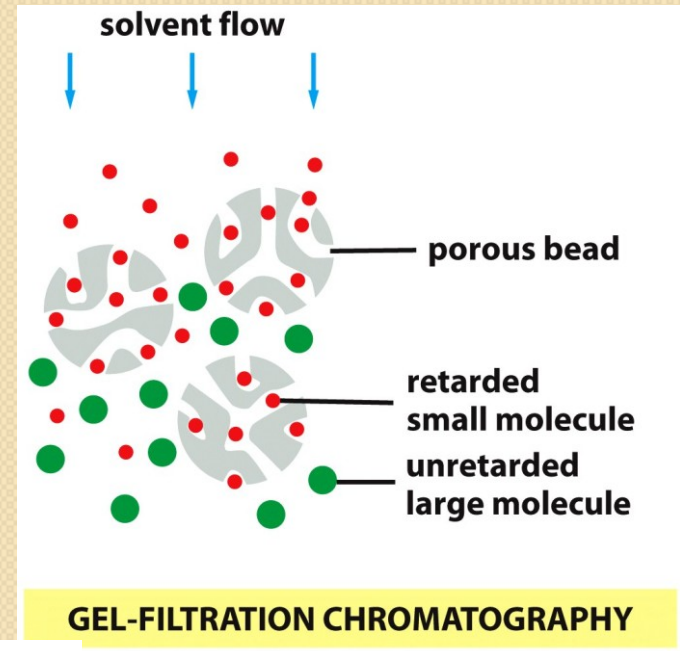
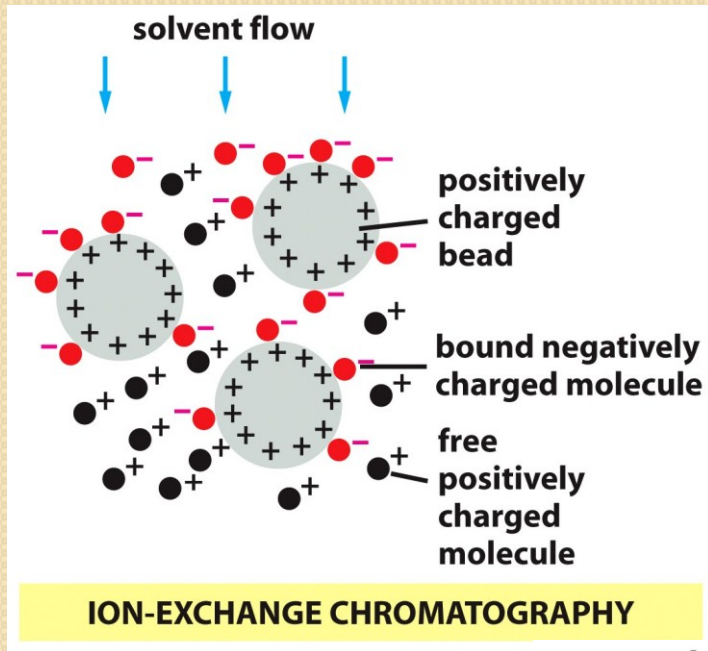


Kromatografi

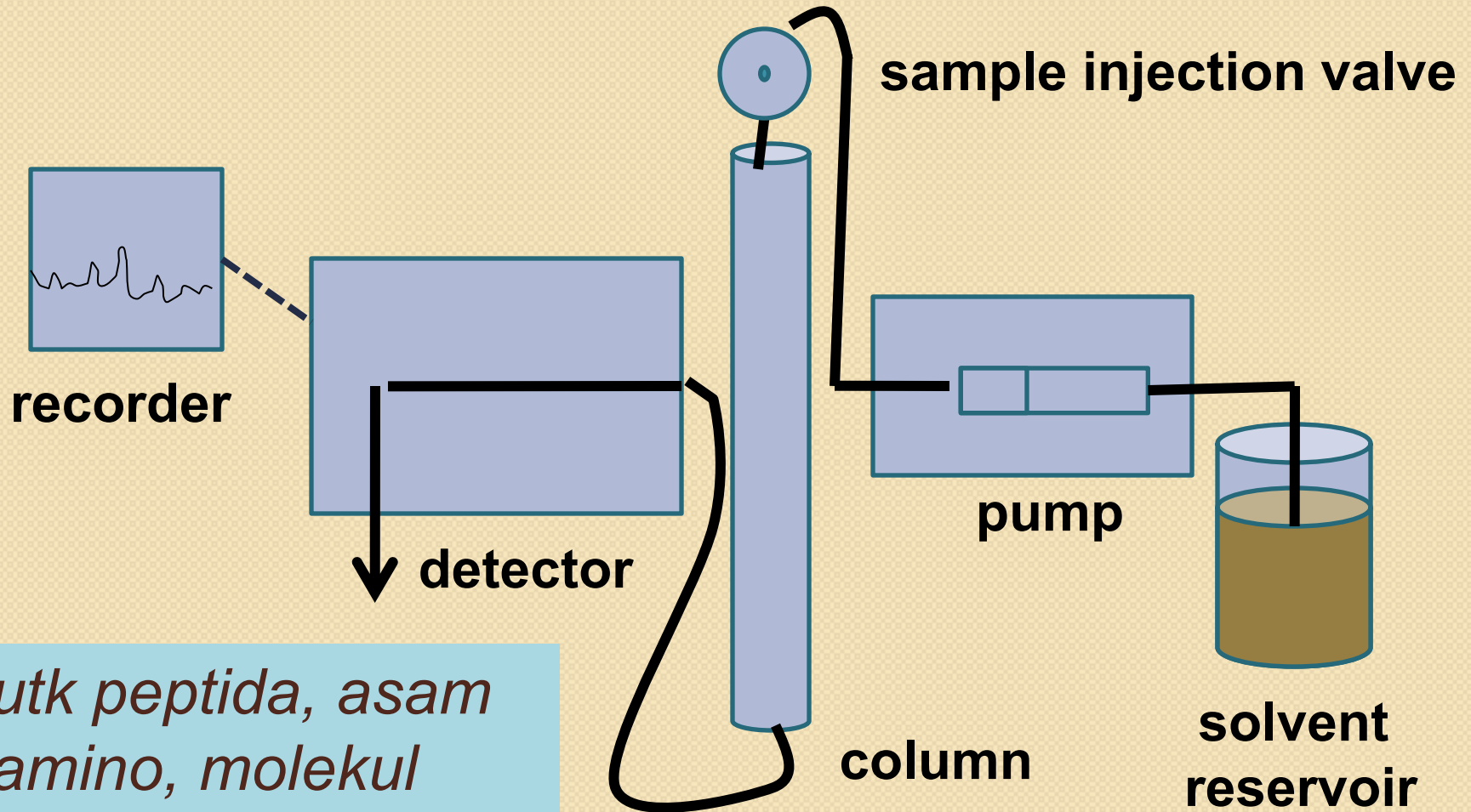
- pemisahan yg berdasarkan ukuran molekul
- yg lebih besar lebih lambat melewati kolomnya



Kromatografi :Variations.....

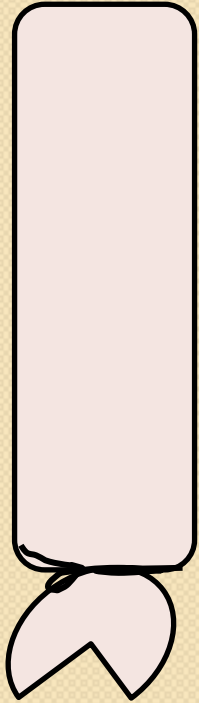


High Performance (Pressure) Liquid Chromatography (HPLC)

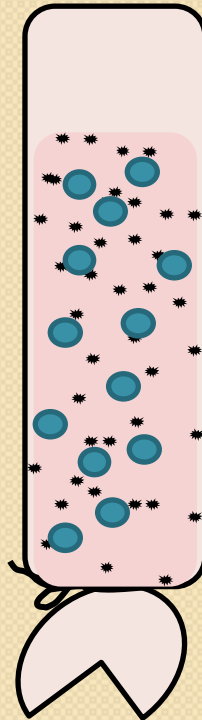


*utk peptida, asam
amino, molekul
kecil yg lain*

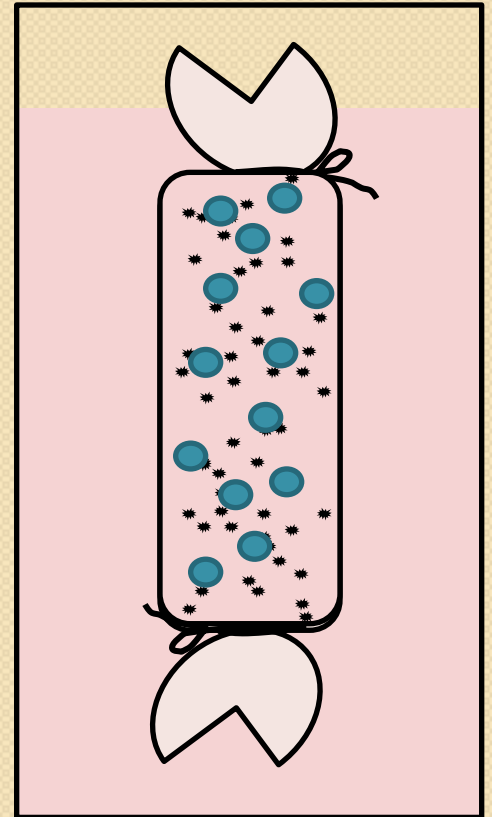
Dialisis: molekul² dipisahkan oleh tekanan osmotik dan atas ukurannya



“*dialysis bag*” –
dibuat dari bahan
yg permeabel
terhadap molekul²
ukuran kecil

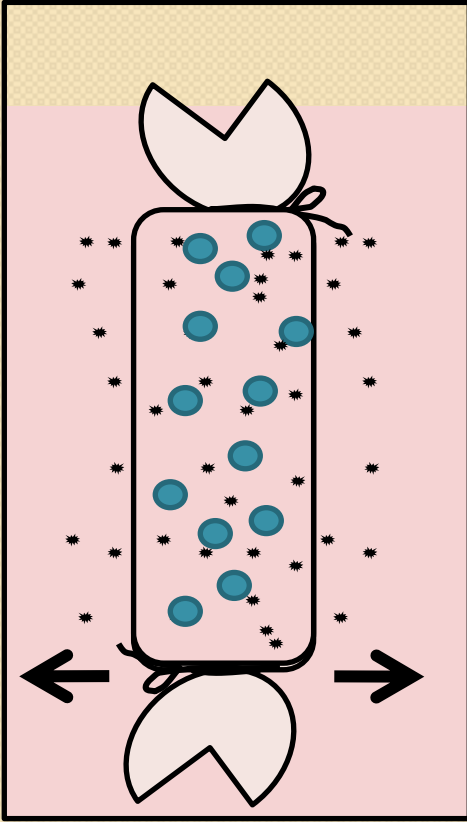


sampel campuran
molekul besar/kecil
dimasukkan
dialysis bag.
Ujungnya diikat.

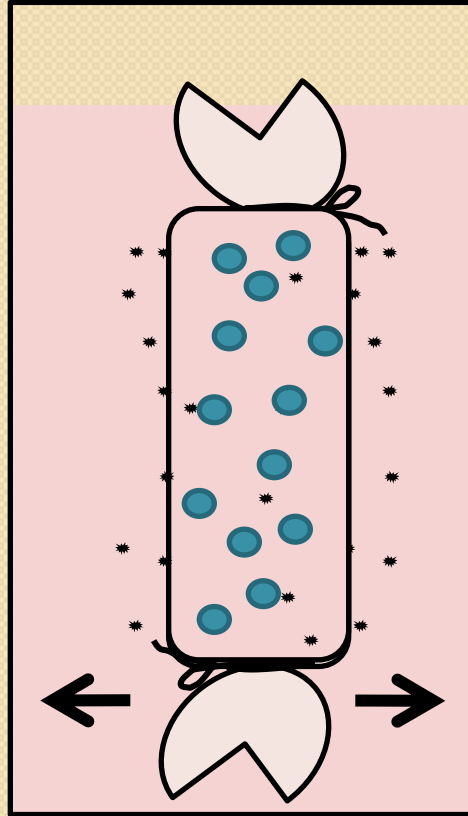


dialysis bag
dimasukkan ke
larutan buffer

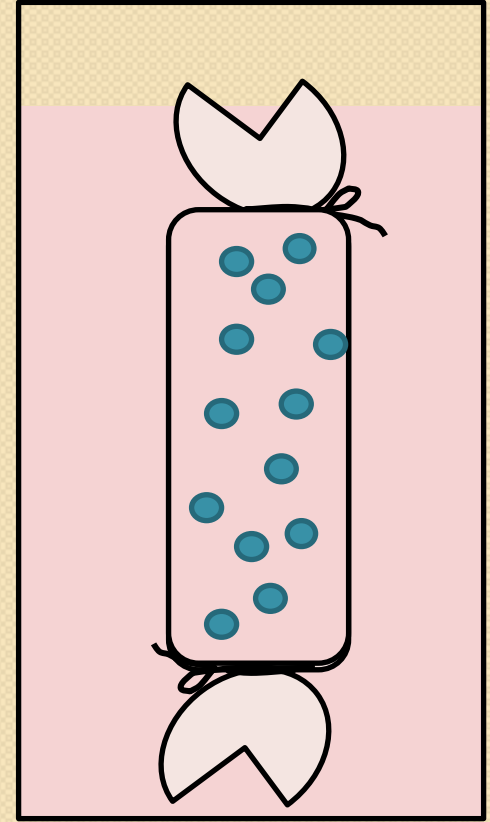
Dialisis: molekul² dipisahkan oleh tekanan osmotik dan atas ukurannya



molekul kecil
pindah ke buffer
(sesuai dgn gradien
osmotik/konsentrasi)

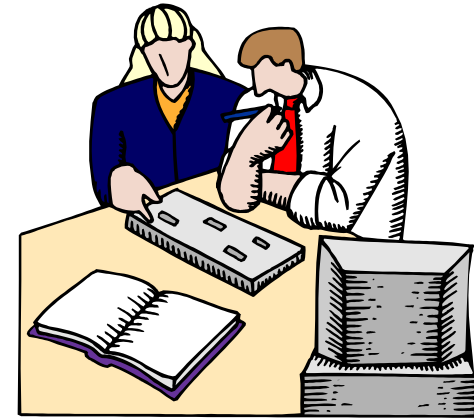


larutan buffer terus
diganti $\Rightarrow$ molekul
kecil terus pindah
keluar



pada akhirnya
dialysis bag
hanya berisi
molekul besar

Praktikum 3 pH meter, Persiapan Larutan Penyangga dan Kromatografi



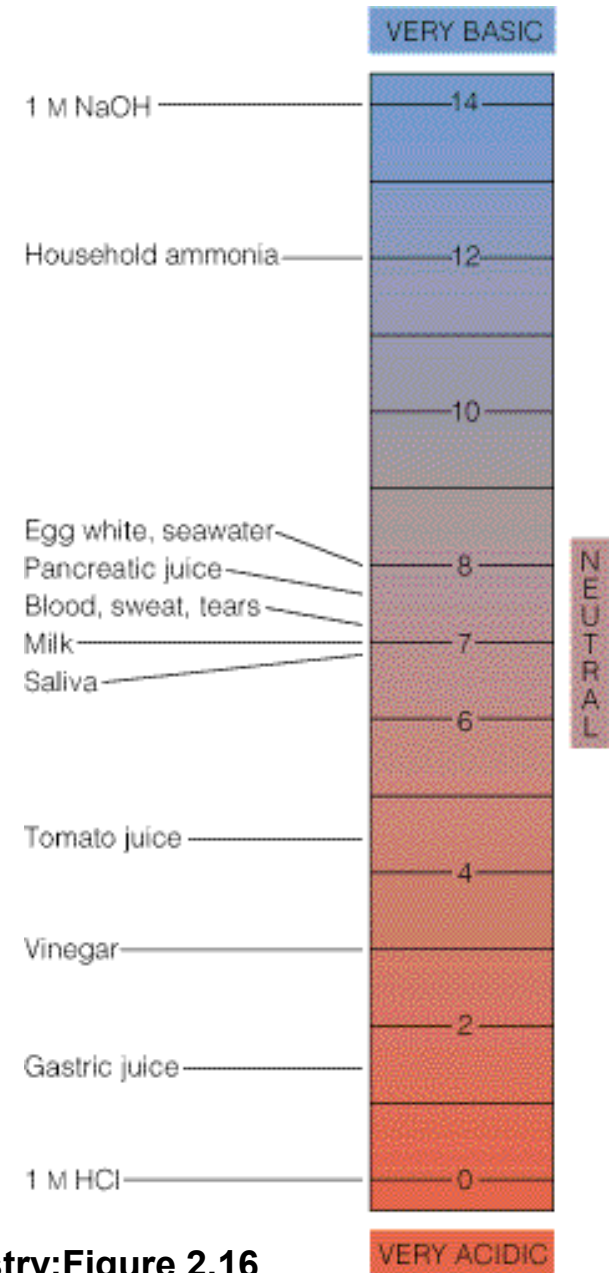
- Konsep dasar larutan penyangga (*buffer*)
- Kelompok praktikum
- Bagian praktikum
- Laporan praktikum

Teori dasar: *pH and buffers*

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

where $[\text{H}^+]$ is the molar concentration of hydrogen ions in solution

Since pH is a logarithmic scale a difference of one pH unit is equivalent to a ten-fold difference in hydrogen ion concentration



Biochemistry:Figure 2.16

Konsep dasar: *pH and buffers*

Maintaining pH is biologically important

pH blood 7,35 $\leftrightarrow$ 7,45

if $< 7 \Rightarrow$ acidotic coma

if $> 7,8 \Rightarrow$ tetany

$\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$ (carbonate/bicarbonate) is the main buffer in blood but many other buffer systems are important in the body

hemoglobin (berkaitan dgn sistem $\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$)

fosfat (cairan intraselular)

amonia $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$ (urin)

Konsep Dasar: What is a buffer solution?

A buffer solution resists changes in pH when small quantities of an acid or an alkali are added to it.

An acid is a proton donor:



equilibrium constant (K_a) for the dissociation of a weak acid:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

The larger K_a is, the greater is the tendency for the acid to dissociate, that is, the stronger the acid.

p K_a value:

$$\text{p}K_a = -\log(K_a)$$

The stronger the acid the lower its p K_a value

Konsep dasar: Ka and pKa

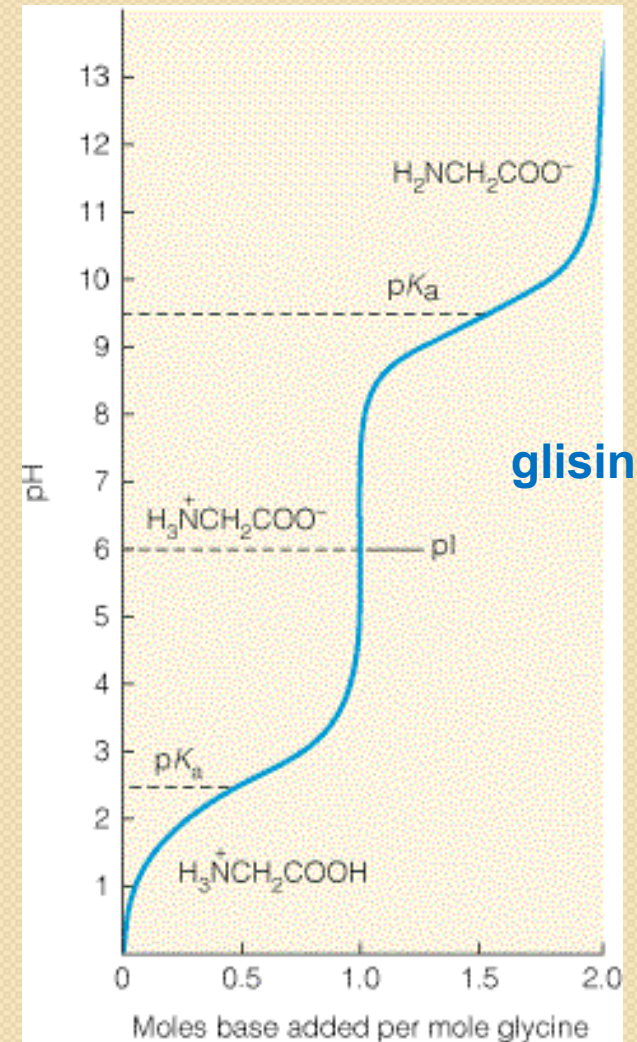
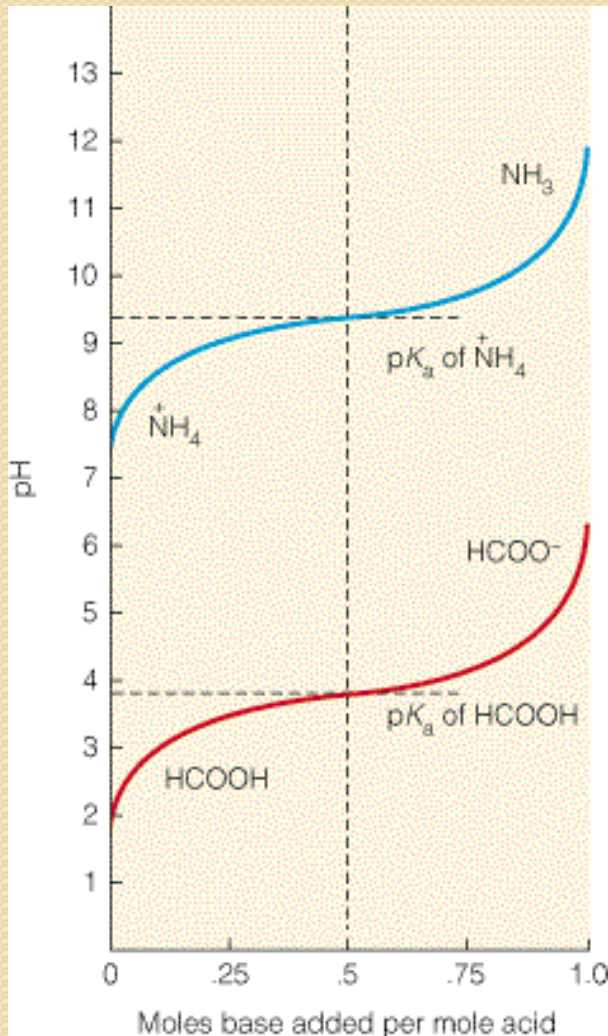
$$pK_a = -\log(K_a)$$

Acid (Proton Donor)		Conjugate Base (Proton Acceptor)		pK _a	K _a (M)
H ₃ PO ₄ Phosphoric acid	⇌	H ₂ PO ₄ ⁻ Dihydrogen phosphate ion	+H ⁺	2.14	7.24 × 10 ⁻³
H ₂ PO ₄ ⁻ Dihydrogen phosphate ion	⇌	HPO ₄ ²⁻ Monohydrogen phosphate ion	+H ⁺	6.86	1.38 × 10 ⁻⁷
HPO ₄ ²⁻ Monohydrogen phosphate ion	⇌	PO ₄ ³⁻ Phosphate ion	+H ⁺	12.4	3.98 × 10 ⁻¹³
H ₂ CO ₃ Carbonic acid	⇌	HCO ₃ ⁻ Bicarbonate ion	+H ⁺	6.37	4.27 × 10 ⁻⁷
HCO ₃ ⁻ Bicarbonate ion	⇌	CO ₃ ²⁻ Carbonate ion	+H ⁺	10.25	5.62 × 10 ⁻¹¹

■ Phosphoric acid series

■ Carbonic acid series

Konsep dasar: pKa and titrating with a base (or acid)



Konsep Dasar: Caranya utk mengukur pH

pH meter



can provide a precise quantitative measurement of pH

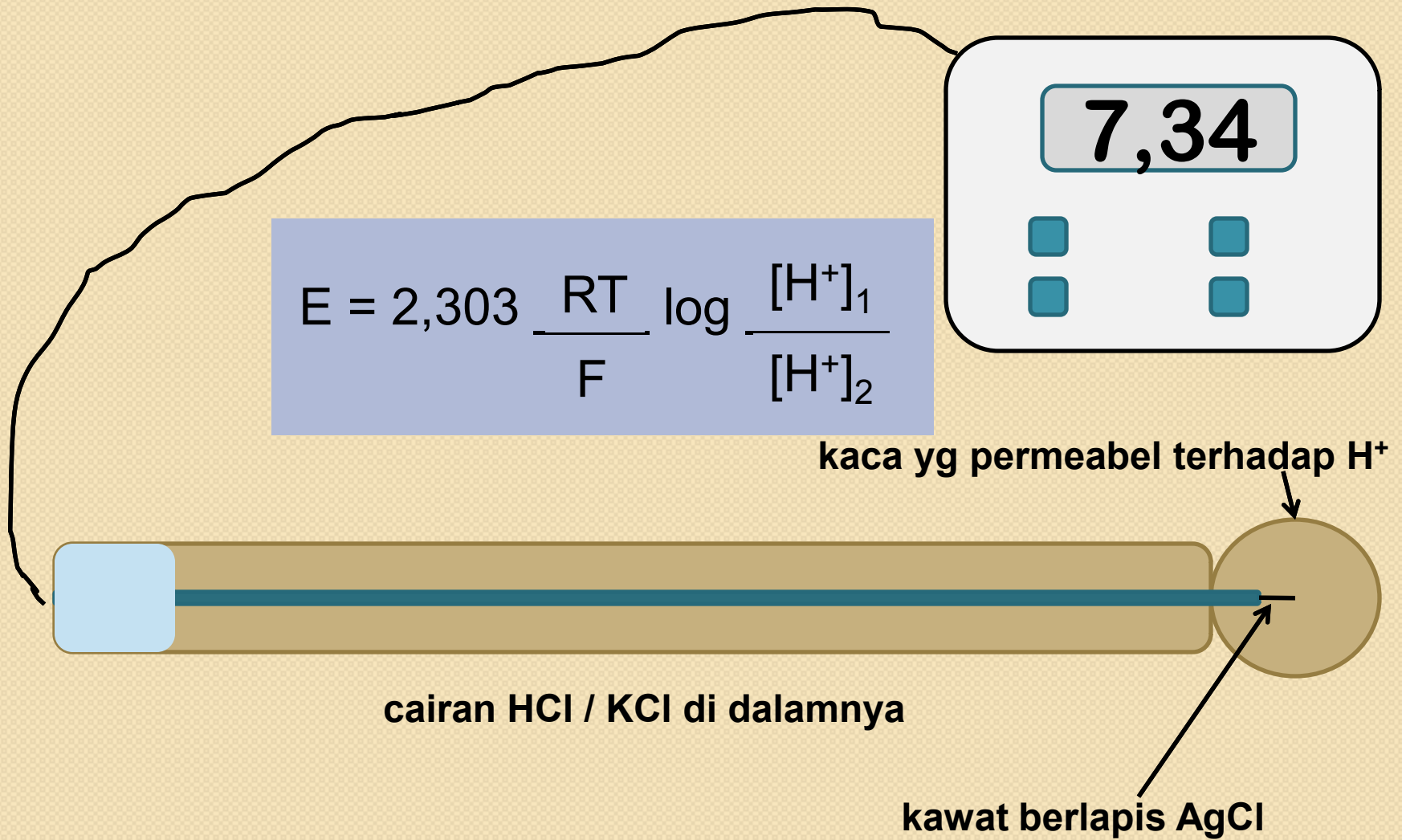
*kertas pH
(kertas litmus)*



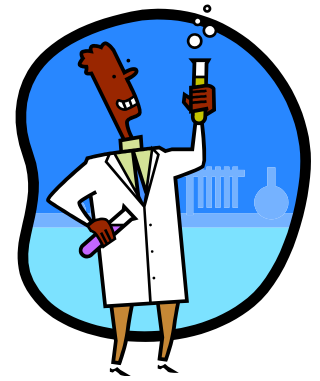
provides a qualitative idea of pH



elektroda pH



Kelompok Praktikum



Kelompok 1 (masuk pk 08:00):

Dedy

Ernawati

Mara Imam

Fera

Roy

Taufik

Martina

Lily

Dorra

Anwar

Kelompok 2 (masuk pk 12:00):

Taya Elsa

Leo

Yeni

Dita

Musthari

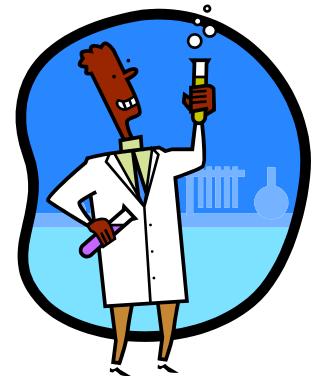
Ningrum

Donny

Siti

Grup praktikum ditentukan setiap hari praktikum

KEGIATAN: Praktikum pH meter, Persiapan Larutan Penyangga dan Kromatografi



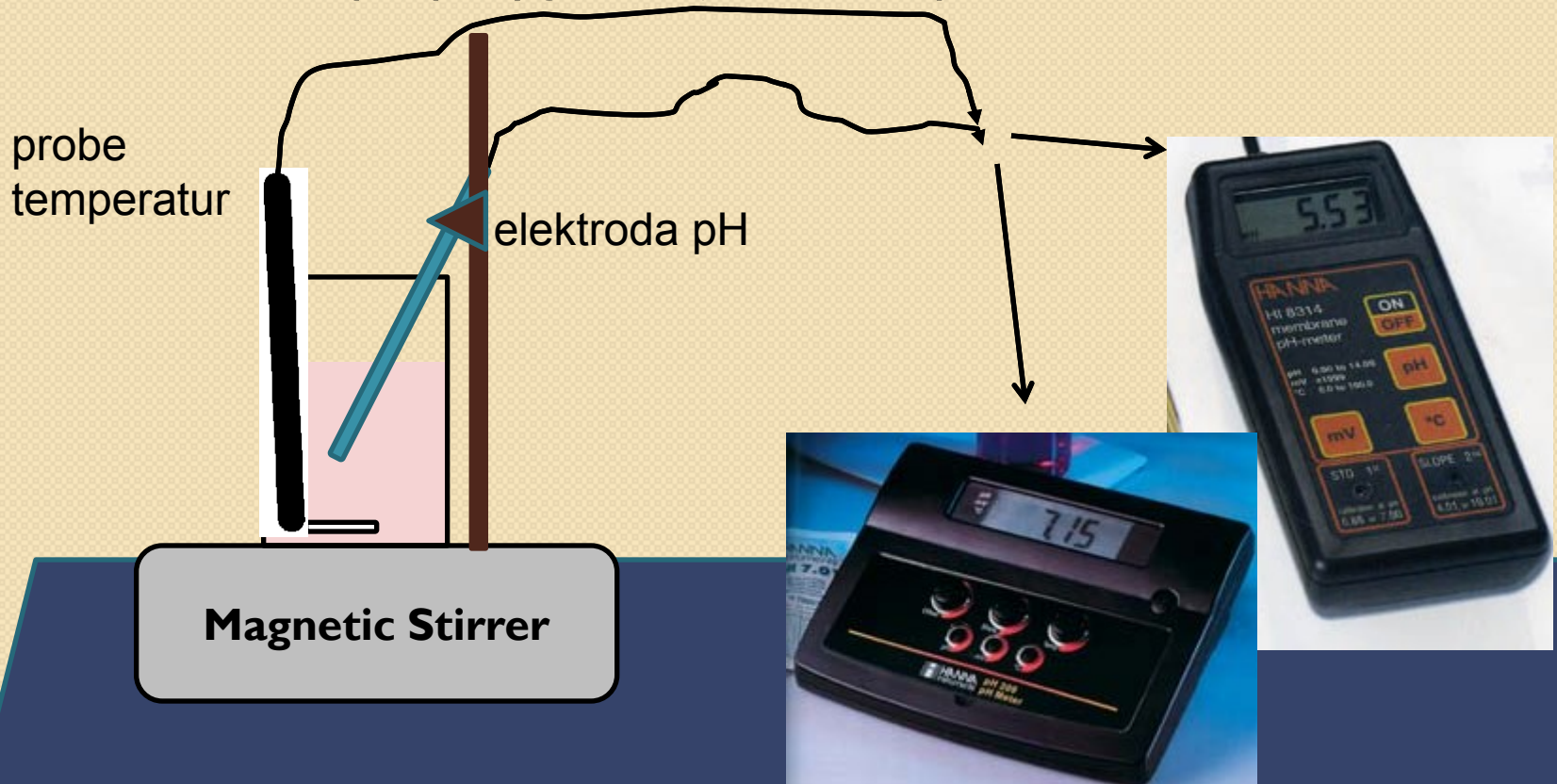
Grup meja terdiri dari 2 orang

- ✓ pH meter diperkenalkan
- ✓ siapkan buffer fosfat (titrasi)
- ✓ latihan pengenceran dari larutan stok glukosa (hasil diperiksa dengan reaksi Benedict)
- ✓ komponent daun dipisahkan dgn teknik kromatografi kolum

Persiapan buffer fosfat

Cara kerja titrasi:

1. larutan fosfat yg akan dititrasi ditaruh di atas magnetic stirrer
2. pakai stel dan klem supaya elektroda pH tidak kena magnet yg berputar
3. masukan probe temperatur di sampingnya
4. tambah 500 μ L larutan fosfat yg lain; aduk dan baca pHnya
5. teruskan sampai pH yg bertujuan disampaikan



Pengenceran – stok glukosa (5%)

- ✓ **1:10**
- ✓ **serial: 0,1X, 0,01X dan 0,001**
- ✓ **serial: 0,3X, 0,03X dan 0,003**
- ✓ **serial: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 dan 1:16**

Cobalah pikirkan caranya yang paling efisien untuk menyipakan pengenceran² tsb sebelum masuk ke ruangan laboratorium

Pengenceran – stok glukosa (5%)

Hasilnya akan diperiksa dgn Reaksi Benedict

- Reagensi Benedict: dibuat minggu yg lalu
- per tabung reaksi, masukkan 5ml reagensia Benedict dan 8 tetes larutan yg ingin diperiksa
- dikocok hingga homogen dan dipanaskan dalam water bath yg mendidih (hati-hati)
- biarkan dingin dan perhatikan hasilnya (perubahan warna)

Kromatografi

Demo teknik kromatografi ekstrak dari daun dengan bahan yang sederhana

(kolumnya dibuat dari natrium bikarbonate dan pelarut termasuk tinner, aseton dan etanol)

Laporan: per grup praktikum

Kunci nilai tugas grafik pertama.....

- Grafik :

- Judul umum 0.5
 - Judul akses (2) 0.5
 - Rapi 1
 - Jelas (ukuran, skala, dll) 1
- $\times 2 = 6$

- Kesimpulan:

- Berdasarkan grafik (2) 1
 - Komentar singkat atas prediksi awal dan hasil yang diperoleh 0.5
- $\times 2 = 3$

- Saran

1 = 1

OpenWetWare

Apakah ada pertanyaan?

References:

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell (5th ed)*, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.

Dunn, S.M.J. 1990. *PMCOL 306 Course Notes*, University of Alberta Pharmacology Department

Holme, D. J. & Peck, H. 1998. *Analytical Biochemistry (3rd ed)*, Addison Wesley Longman Inc., New York.