

Primjena spektrofotometrije u učenju Biologije i ostalih predmeta prirodnoslovnog područja

Nikolina Sabo

Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Ulica Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek, Hrvatska
nsabo@biologija.unios.hr

SAŽETAK

Brze promjene u društvu uvjetovane kontinuiranim novim znanstvenim spoznajama zahtijevaju i kontinuirane promjene paradigme poučavanja i učenja Biologije, ali i ostalih nastavnih predmeta. Zato je neizostavno aktivno učenje koje podrazumijeva primjenu istraživačkih vještina, suradničkog učenja i kreativnog izražavanja. U istraživanjima s područja prirodnih znanosti primjenjuju se brojne instrumentalne metode, od kojih je spektrofotometrija jedna od temeljnih analitičkih tehnika u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. Osim primjene u znanstvene i istraživačke svrhe, spektrofotometrija se postupno implementira i u škole i sve je češća tema istraživanja s područja obrazovanja prirodoslovnih predmeta. Cilj je pronaći jednostavan, prenosiv i jeftin spektrofotometar za laboratorijske aktivnosti u školama ili pronaći idealne komponente za samostalnu izradu instrumenta, čime bi spektrofotometrijske metode bile dostupne i učenicima u školama s ograničenim resursima. Brojni su primjeri dobre prakse koji ukazuju na to da spektrofotometar ima potencijal u konceptualnom razumijevanju i kako se može implementirati u nastavu. Poučavanje koje se temelji na inovativnim metodama i novim tehnologijama povećava interesa učenika za prirodoslovlje i motivaciju učenika za samostalne aktivnosti, koje omogućuju kvalitetnije usvajanje i razumijevanje nastavnih sadržaja te primjenu stečenih znanja i vještina u rješavanju problema, što je ključan korak u pripremanju mladih ljudi za odgovoran život u modernom društvu.

Ključne riječi: *aktivno učenje; istraživačko učenje; prirodoslovnost pristup*

UVOD

Svijet u kojem danas živimo karakteriziraju brze i radikalne promjene u svim područjima života, a sa sobom donose i nove zahtjeve na tržištu rada. Uslijed razvoja novih tehnologija i revolucionarnih znanstvenih postignuća dolazi do promjena u obrazovnim prioritetima i restrukturiranja nastavnih sadržaja (Tot, 2010). U tom kontekstu, zadatak odgojno – obrazovnog sustava je pratiti zahtjeve tržišta rada i, sukladno tome, prilagođavati način poučavanja kojim učenici stječu specifične kompetencije, ali i one opće koje podupiru razvoj i stjecanje specifičnih. Isto tako, problemi poput onečišćenja prirode i okoliša, globalnog zatopljenja, prekomjerne eksploatacije resursa, neravnomjerne raspodjele hrane, pojave i širenja zaraznih bolesti, nedostatka pitke vode i energije te smanjenja biološke raznolikosti postali su naša svakodnevica (Braš Roth i sur., 2017) te je zadatak obrazovanja odgojiti učenike, buduće aktivne građane, za djelovanje u sprječavanju ovakvih problema. Iz navedenog proizlazi da je važno osvijestiti potrebu za promjenom pristupa stjecanju temeljnih kompetencija učenika u području prirodnih znanosti (Domazet, 2007). Prirodnoslovlje objedinjuje biologiju, kemiju, matematiku, fiziku, geologiju, geofiziku i interdisciplinarnu prirodnu znanost, a sve te znanosti pridonose prirodoslovnom opismenjavanju učenika. Prirodnoslovna pismenost jedna je od ključnih kompetencija, a ključna je u suvremenom društvu suočenom s globalnim problemima, budući da je prirodoslovno pismen pojedinac sposoban odgovarati na svakodnevne životne izazove koristeći se vlastitim kompetencijama te kritičkim i kreativnim razmišljanjem (Braš Roth i sur., 2017).

Recentna istraživanja ukazuju na to da je interes učenika za usvajanjem znanja prirodoslovnog područja u značajnom opadanju, iako je posljednjih godina uočena povećana potražnja na tržištu rada (Maltar Okun, 2019; Simon, 2016; Tytler i Osbourne, 2012; Domazet, 2007). Pad interesa događa se već u

osnovnoj školi, kada je usvajanje kompetencija iz područja prirodoslovlja najučinkovitije (European Commission, 2007). Do danas su provedena brojna obrazovna istraživanja u Hrvatskoj, kao i analize vanjskoga vrednovanja uspješnosti učenja prirodoslovlja u okviru PISA istraživanja (Braš Roth i sur., 2017) te sadržajne i metodološke analize ispita državne mature iz biologije, a rezultati nedvojbeno ukazuju na probleme povezane s nastavnim programom i uvriježenim načinima poučavanja u školama (Garašić i sur., 2018). Uslijed jasne potrebe za poboljšanjem, kurikularnom reformom donesene su značajne promjene u obrazovnom sustavu (barem na razini propisanih predmetnih i međupredmetnih kurikuluma), koji se sada temelji na ideji aktivnog učenika koji kroz samostalno istraživanje i suradničko učenje usvaja nova znanja i razvija svoje sposobnosti i vještine. Tot (2010) navodi da je cilj svih reformi obrazovanja „prijelaz od poučavanja (prijenosa sadržaja) na učenje (stjecanje i razvoj kompetencija)“. Drugim riječima, težište suvremene nastave usmjereno je na aktivno učenje koje planira nastavnik i stavlja sebe u ulogu moderatora, fascilitatora i mentora (Bognar i Matijević, 2005). Na taj se način razvijaju i generičke kompetencije, različiti oblici mišljenja poput kreativnog i kritičkog mišljenja kao i rješavanja problema, razvija se apstraktno mišljenje, povećava se intrinzična motivacija, potiče izgradnja i povezivanje koncepata te ih se usmjerava na preuzimanje odgovornosti za vlastito učenje i na razvoj samoreguliranog učenja. Ovakav konceptualni okvir omogućuje bolje razumijevanje znanstvenih spoznaja i ostvarivanje odgojno-obrazovnih ishoda na višim kognitivnim razinama (Braš Roth i sur., 2017).

Biološka znanja ključna su u suočavanju s brojnim izazovima današnjice, stoga je implementacija suvremenih nastavnih metoda u poučavanje Biologije neophodna u osposobljavanju učenika za kreativno i inovativno rješavanje problema. Cilj suvremene nastave je osposobiti učenike za cjeloživotno učenje, poučiti ih prirodoznanstvenoj metodi, načinima istraživanja, otkrivanja i dolaženja do znanstvenih spoznaja, rješavanju problema, donošenju zaključaka na temelju kritičkog promišljanja te primjeni stečenih znanja u svakodnevnom životu (Garašić i sur., 2018; Braš Roth i sur., 2017; Podrug, 2017). Prema tome, iskustveno učenje, istraživačko učenje i učenje otkrivanjem postaju osnova poučavanja u Biologiji. Kroz istraživačko učenje učenici uče principom znanstvene metodologije i razvijaju znanstveni stil razmišljanja, istraživačke vještine, ali i organizacijske sposobnosti. Suvremenu školu, stoga, karakterizira promijenjena uloga nastavnika i učenika (Labak i sur., 2014), pri čemu nastavnici nastoje kod svojih učenika razvijati naviku samostalnog učenja, primjenjujući različite metode i oblike aktivnog učenja s razumijevanjem, kojim se „usvajaju znanja, razvijaju vještine i formiraju navike“ (Previšić i sur., 2007). Uspješnost provedbe odabranih metoda poučavanja ovisit će o učeničkim interesima za pojedine aktivnosti, kao i o primjerenosti odabranih aktivnosti u usvajanju novih koncepata (Balažinec i sur., 2020; Garašić i sur., 2018). Većina nastavnika¹ i dalje preferira frontalni oblik nastave (Zidar i sur., 2018), uglavnom radi veće sigurnosti u ostvarivanje cilja sata i predviđenih ishoda, a često i uslijed nedovoljne informiranosti o inovativnim metodama i postupcima. Ipak, u usporedbi s frontalnim oblikom nastave i tradicionalnim metodama, primjenom metoda aktivnog učenja učenik postaje aktivni subjekt u nastavnom procesu čime se dugoročno smanjuje predavačka funkcija nastavnika, a uspostavlja interakcija između nastavnika i učenika (Labak i sur., 2014). Prirodni način učenja temelji se na vlastitom iskustvu i tada najviše i najlakše učimo. Primjenom strategija aktivnog učenja u prirodoslovnim predmetima učenik stječe znanje rješavanjem problema, odnosno samostalnim istraživanjem (promatranjem, objašnjavanjem, zaključivanjem) koristeći se inovativnim nastavnim medijima (Bognar i Matijević, 2005; Podrug, 2017), koji omogućuju „bolje, učinkovitije i trajnije usvajanje nastavnih sadržaja te postizanje pratećih ciljeva“ (Pranjić, 2005). U

¹ Zbog aktualne legislative, u ovom radu koristi se termin „nastavnik“, a odnosi se osnovnoškolske učitelje i srednjoškolske nastavnike.

prirodnim znanostima primjenjuju se brojne instrumentalne metode, a jedna od najšire zastupljenih i najčešće korištenih je spektrofotometrija (Morris, 2015). Kao takva, spektrofotometrija se može iskoristiti u integriranju znanja i postati osnova za uspostavu interdisciplinarnog poučavanja. Kako bi izvedba spektrofotometrijske analize bila uspješna, a rezultati točni i pouzdani, potrebno je razumjeti načela i principe na kojima se sama metoda temelji.

Slijedom navedenog, cilj ovog rada je predstaviti spektrofotometrijsku metodu, navesti temeljna znanja i nove spoznaje o metodi koje će nastavnicima upotpuniti stručno znanje i motivirati ih na promišljanje o primjeni instrumenta koje se koriste u znanstvenim istraživanjima za poučavanje Biologije, ali i drugih predmeta prirodoslovnog područja. Također, cilj rada je i predstaviti primjere dobre prakse, odnosno prijedlog istraživanja u nastavi biologije i ostalih predmeta prirodoslovnog područja u kojima se spektrofotometar može iskoristiti, kako bi učenici razvijali istraživačke vještine i interes za znanost.

SPEKTROFOTOMETRIJA

Zahvaljujući digitalizaciji i razvoju tehnologije, spektrofotometrija je postala neizostavna tehnika u brojnim kvalitativnim i kvantitativnim analizama. Ta se instrumentalna metoda zasniva na interakciji uzorka sa svjetlošću (elektromagnetskim zračenjem) (Morris, 2015). Priroda ove interakcije ovisi o fizikalnim svojstvima materijala, kao što su prozirnost, oblik površine, čistoća ili debljina (Germer i sur., 2014). Kemijski spojevi apsorbiraju (upijaju), transmitiraju (provode), disperziraju (raspršuju) ili reflektiraju (odbijaju) svjetlost u točno određenom rasponu valnih duljina, a mogu i emitirati svjetlost zbog, primjerice, apsorpcije u određenom dijelu spektra, pri čemu dolazi do remisije svjetlosti (Germer i sur., 2014). Uzorak apsorbira ili emitira zračenje određenog intenziteta koje se mjeri i analizira, čime je omogućena identifikacija, kao i određivanje koncentracije spojeva praćenjem količine apsorbirane svjetlosti (Germer i sur., 2014; Atkins, 1989). Spektrofotometrija se primjenjuje u različitim područjima znanosti, kao što su kemija, fizika, biokemija, kemijsko inženjerstvo, ali i u kliničkim ispitivanjima. U biokemijskim analizama koristi se za praćenje enzimske kinetike, dok u kliničkim ispitivanjima u svrhu analize krvi ili tkiva. Od niza spektrofotometrijskih tehnika, u primjeni je najčešće apsorpcijska spektrofotometrija koja se temelji na mjerenju apsorbancije u uzorku kroz koji se propušta svjetlost različitih valnih duljina. Apsorpcija se može pratiti u širokom rasponu valnih duljina, koji obuhvaća ultraljubičasti (UV), vidljivi (VIS), infracrveni (IR), mikrovalni te radiovalni dio spektra elektromagnetskog zračenja.

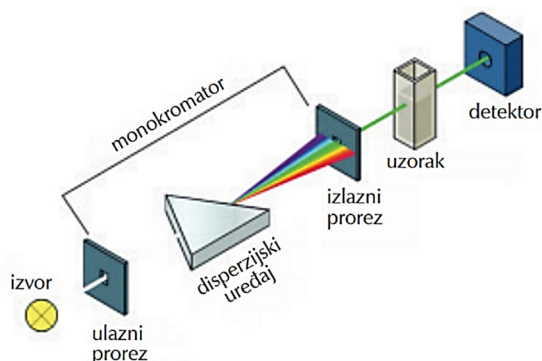
UV/VIS spektrofotometrija

Apsorpcijska spektrofotometrija koja se provodi u UV i VIS dijelu spektra naziva se UV/VIS spektrofotometrija i najpopularnija je tehnika u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi zbog velike brzine izvođenja, osjetljivosti, selektivnosti, jednostavnosti, točnosti i široke primjenjivosti. Konkretno, UV/VIS spektrofotometrijske analize široko su zastupljene u biokemijskim i molekularnim laboratorijima jer su ključne u određivanju koncentracije bioloških molekula u otopinama (Trumbo i sur., 2013). Metoda se bazira na interakciji UV i VIS zračenja s atomima i molekulama, koja potiče elektronske prijelaze između osnovnog i pobuđenog stanja, pri čemu se stvaraju karakteristični profili apsorpcije ili emisije (Burgess, 2017). Osim korištenja u znanstvene i istraživačke svrhe, spektrofotometrija se postupno implementira i u škole. U današnje vrijeme sve više škola, u prvom redu prirodoslovnih gimnazija, ulaže u laboratorijsku opremu i za ostvarivanje propisanih ishoda uvrštava vježbe iz biokemije i molekularne biologije kako bi učenicima za vrijeme srednjoškolskog obrazovanja bilo omogućeno stjecanje prijeko potrebnog iskustva i prakse. Za uspješnu

implementaciju spektrofotometrije u nastavu potrebno je, prvenstveno, znati rukovati spektrofotometrom i poznavati njegovu građu, razumjeti na kojem se principu zasniva metoda, u koje svrhe se može koristiti, kakvi instrumenti su dostupni na tržištu i koje specifikacije su potrebne za realizaciju planiranih eksperimenata.

Izvedba i princip rada spektrofotometra

Instrument koji se koristi u spektrofotometriji naziva se spektrofotometar (Mihoci, 2015). To je uređaj koji u intervalima mjeri promjene u apsorpciji ili transmisiji elektromagnetskog zračenja u uzorku kroz koji se propušta svjetlost u odgovarajućem rasponu valnih duljina. Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, sustav koji rasipa zračenje – monokromator i uređaj za mjerenje intenziteta propuštene svjetlosti – detektor (Lema i sur., 2002). Prostorni razmještaji navedenih komponenti i princip rada spektrofotometra shematski su prikazani na slici 1.

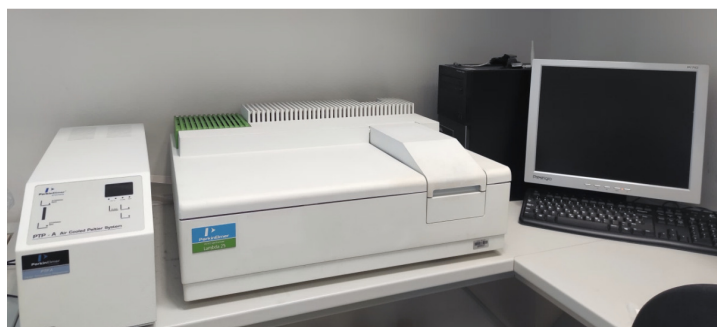


Slika 1 Osnovni dijelovi spektrofotometra i princip rada (izvor: PerkinElmer)

Spektrofotometrijsko određivanje temelji se na prolasku zrake svjetlosti kroz otopinu uzorka, pri čemu dio zrake apsorbiraju molekule u uzorku, a ostatak se propušta. Izvor svjetlosti emitira bijelu (polikromatsku) svjetlost te, ovisno o vrsti lampe, određuje valnu duljinu koja se propušta kroz uzorak. U VIS spektrofotometriji najčešće se koristi lampica s volframovom niti, halogene ili ksenonske žarulje, dok se za UV dio spektra odabire deuterijeva lampica (Mihoci, 2015). Većina spektrofotometara pokriva raspon valnih duljina reda veličine od 190 do 1100 nm. Monokromator, kao što i sam naziv sugerira, prema detektoru propušta svjetlost samo jedne valne duljine (monokromatska svjetlost), a najčešće se sastoji od optičke rešetke ili optičke prizme koje razdvajaju svjetlost na manje dijelove, točnije skupine susjednih valnih duljina koje se nazivaju vrpce. Detektor definira osjetljivost uređaja, a najčešće se koriste fotomultiplikator, fotoosjetljive diode ili CCD čipovi. Ima ulogu u kvantifikaciji intenziteta propuštene, tj. neapsorbirane svjetlosti, jer stvara odgovarajući električni signal koji se pojačava i pretvara u apsorbciju. Uzorak je u spektrofotometru smješten između monokromatora i detektora u plastičnoj, staklenoj ili kvarcnoj posudici kružnoga ili kvadratnoga presjeka – kivetu (Mihoci, 2015). Tip kivete (primjer na slici 3) odabire se s obzirom na uređaj i metodu koja se koristi. Kada je uzorak osvijetljen određenim rasponom valnih duljina, intenzitet svjetlosti koju molekule u uzorku propuštaju kvantificira se pomoću detektora, a mjereni električni signal dalje pojačava procesor signala, tj. monitor računala s kojim je spektrofotometar povezan (Lema i sur., 2002). Rezultat mjerenja u pojedinim valnim područjima (intervalima) je spektrofotometrijska krivulja ili UV/VIS spektar, koji nastaje mjerenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao pri zadanoj valnoj duljini. Spektrofotometrijska mjerenja u UV području spektra provode se u rasponu valnih duljina od 185 do 400 nm. Određivanje boje tvari najčešće se provodi u VIS području u rasponu od 400 nm do 700 nm, koje zauzima vrlo mali dio spektra (Mihoci, 2015).

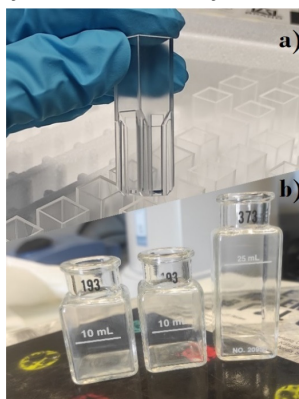
Dizajn i performanse optičkih instrumenata kreću se u rasponu od jeftinih mobilnih kamera do vrlo skupih, sofisticiranih uređaja. Točnost spektrofotometrijskih mjerenja ovisi o dizajnu i kalibraciji

spektrofotometra, izboru referentnog standarda i interakciji uzorka s mjernim instrumentom (Germer i sur., 2014). Spektrofotometri se najčešće dijele na jednozračne (jednosnopne) i dvozračne (dvosnopne) te neprenosive i prijenosne. Kod jednozračnih spektrofotometara moguće je trenutno mjeriti apsorbanciju samo jednog uzorka pa se apsorbancija referentnog uzorka (otapala) mora izmjeriti zasebno, a dobiveni spektri naknadno obraditi. Dvozračni spektrofotometri mogu biti izvedeni u prostornoj ili vremenskoj domeni, a princip rada podrazumijeva dvije zrake svjetlosti koje istovremeno prolaze i kroz referentni i ispitivani uzorak. U ovom slučaju izmjerene apsorbancije (spektrofotometrijski spektri) automatski se oduzimaju jedna od druge pa dodatna obrada spektra nije potrebna (Pitinac i Pecikozić, 2016). Razvojem tehnologije značajno se poboljšala izvedba oba tipa uređaja, no potonji se ipak preferira zbog određenih prednosti. Na slici 2 prikazan je primjer dvozračnog instrumenta koji se u biokemijskom laboratoriju može koristiti u brojnim analizama jer podržava različite metode rada. Prema specifikacijama, moguća su mjerenja na tekućim uzorcima u rasponu valnih duljina od 190 do 1100 nm. Uz njega se na slici 2 nalazi i uređaj za termoregulaciju koji omogućuje kontrolu temperature kada je prilikom mjerenja potrebno održavati određenu temperaturu reakcijske smjese. Prednost spektrofotometra s dvostrukim snopom u odnosu na jednosnopni je pouzdanija detekcija i veća stabilnost, kao i kratko vrijeme zagrijavanja lampe, čime se produljuje vijek trajanja (izvor: PerkinElmer). No, napredna tehnologija rezultira i visokom cijenom uređaja.



Slika 2 Spektrofotometar Perkin-Elmer Lambda 25 (u sredini) i PTP A (Peltier Temperature Programmer, Perkin Elmer) uređaj za termoregulaciju (lijevo) koji omogućuje kontrolu temperature u rasponu od 0 ° do 100 ° C (autor fotografije: N.Sabo)

S druge strane, jednozračni spektrofotometri u većini slučajeva jednostavniji su i jeftiniji, manjih dimenzija i time vrlo praktični i pogodni za terenski rad ili rad u laboratoriju. Primjerice, na slici 4 prikazan je spektrofotometar namijenjen za kolorimetrijska ispitivanja i nema mogućnost složenijih ispitivanja, poput praćenja kinetike reakcija.



Slika 3 Kivete koje se koriste u spektrofotometriji: a) plastične UV ili VIS kivete, b) staklene kivete za prijenosni spektrofotometar (autor fotografije: N. Sabo)



Slika 4 Prijenosni spektrofotometar (HACH DR/2010) (autor fotografije: N. Sabo)

Instrument je unaprijed kalibriran za brojna kolorimetrijska mjerenja, a po potrebi je moguće provesti i dodatne kalibracije (izvor: Hach Company). Prednost uređaja sličnih specifikacija u odnosu na dvozračne je isplativost, s obzirom na to da su znatno jeftiniji, a primjenjivi u praksi. Napredniji jednozračni instrumenti pokazuju čak i bolje performanse u odnosu na dvozračne, no samim tim i cijena im je veća. Ipak, u većini slučajeva dvozračni spektrofotometri rade brže i daju reproducibilnije rezultate jer izvode automatsku korekciju gubitka intenziteta svjetlosti pri prolasku snopa kroz uzorak i referentnu otopinu. Osnovna prednost je visoka rezolucija i točno očitavanje spektra apsorbancije. Stoga, za istraživanja u laboratoriju češće se odabiru dvozračni instrumenti, dok su za laboratorijske ili terenske vježbe s učenicima i studentima dostatne i jeftinije varijante jednozračnih instrumenata.

Spektrofotometrijski instrumenti razvijali su se posljednjih dvadesetak godina u smislu točnosti, jednostavnosti korištenja i učinkovitosti. Danas se u suvremenim biokemijskim laboratorijima za različite spektrofotometrijske primjene koriste se i tehnološki napredniji uređaji – nanofotometar (slika 5) i čitač mikrotitarskih pločica (slika 6). Nanofotometar pruža mogućnost odabira različitih metoda, poput mjerenja apsorbancije na pojedinačnoj ili na višestrukim valnim duljinama i izračuna njihova omjera, mjerenja koncentracije, određivanja standardnih krivulja (baždarnih dijagrama) i praćenja enzimske kinetike (izvor: Implen). Osobito je praktičan kod malih količina uzoraka, kao što je to slučaj pri izolaciji DNA ili RNA. Čitač mikrotitarskih pločica (engl. *microplate reader*) omogućuje snimanje UV/VIS spektara i određivanje enzimske aktivnosti u mikrotitarskim volumenima na odgovarajućim UV ili VIS pločicama s određenim brojem jažica (izvor: TECAN). Ovaj uređaj značajno povećava učinkovitost i ubrza analizu jer se istovremeno može napraviti do 96 mjerenja, a prednost je i mala potrošnja uzorka, što je važno ako se na istima provodi više analiza.



Slika 3 Nanofotometar (autor fotografije: N.Sabo)



Slika 4 Čitač mikrotitarskih pločica (autor fotografije: N.Sabo)

Uređaj odgovarajućih specifikacija odabire se ovisno o vlastitim preferencijama, financijskim sredstvima i namjeni. Troškovi kupnje sofisticiranih uređaja i dodatnog i potrošnog materijala prilično su veliki, što implementaciju određenih laboratorijskih tehnika u učionicu čini neizvedivom. Iz tog razloga dizajnirani su jednostavniji komercijalni spektrofotometri namijenjeni ponajviše korištenju u nastavi (primjerice, autori u radovima često koriste modele proizvođača Ocean Optics, PASCO i Vernier početne cijene cca 500 \$). Ipak, ako škola nema mogućnost priskrbiti uređaj ovakvog tipa, postoje i alternativna rješenja. Proučavajući literaturu može se pronaći više prijedloga modela za izradu jednostavnih uređaja na principu "uradi sam", što značajno reducira troškove, budući da je većina komponenti relativno lako dostupna i jeftina (Albert i sur., 2012; Lema i sur., 2002). Primjerice, kao izvor svjetlosti predlaže se korištenje male halogene žarulje ili bijele svjetleće diode (LED), dok kao zamjena za difrakcijsku rešetku može poslužiti kompaktni disk (CD). Među funkcionalnim prijedlozima

optičkih detektora nalaze se pametni telefoni (mobilne kamere), silikonske fotodiode, svjetlosne diode (LED), fototranzistori i fotorezistori (LDR) (Albert i sur., 2012; Scheeline, 2010), koji se konačno spajaju na multimetar. Iz navedenih primjera moguće je zaključiti uređaj ne mora biti skup da bi bio funkcionalan i primjenjiv u nastavi.

Spektrofotometrijsko mjerenje

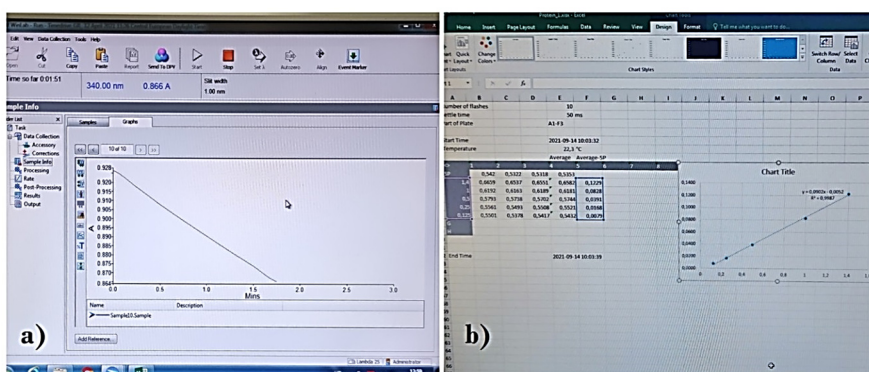
Kada svjetlost prolazi kroz otopinu dolazi do interakcija između zračenja i molekula u otopini, a kao rezultat međusobnih interakcija javljaju se pojave poput polarizacije i loma svjetlosti te apsorpcije zračenja (Atkins, 1989). Navedene pojave osnova su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu tvari, proučavanje kemijskih reakcija, identifikaciju i određivanje strukture određenih spojeva (Burgess, 2017). Dizajn spektrofotometrijskih instrumenata temelji se upravo na principu apsorpcije svjetlosti tvari, odnosno Beer-Lambertovom zakonu (Morris, 2015). Kada se molekula u otopini izloži elektromagnetskom zračenju određene valne duljine, elektroni u molekuli apsorbiraju dio tog zračenja i prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje, dok neapsorbirani dio zračenja prolazi kroz uzorak i bilježi se na detektoru (Strelec, 2009). Spektar elektromagnetskog zračenja analizira se spektrofotometrom, koji mjeri količinu fotona, odnosno intenzitet svjetlosti koji se apsorbira nakon prolaska kroz otopinu uzorka. Spektar je uređeni niz dobiven rastavljanjem polikromatske svjetlosti na sastavne boje razvrstane prema valnoj duljini. Monokromator propušta elektromagnetsko zračenje (ulazno zračenje, I^0) točno određene valne duljine kroz uzorak u kiveti pri čemu zraka prolazi određeni put (ℓ). Uzorak apsorbira dio zračenja, a količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je nepoznatoj koncentraciji ispitivane tvari u uzorku. Onaj dio zračenja koji nije apsorbiran prolazi kroz uzorak i mjeri se na detektoru. To zračenje naziva se propušteno (transmitirano) (I) i izražava kao apsorbancija (A), odnosno logaritam omjera upadnog i propuštenog zračenja. Beer – Lambertov zakon definira linearan odnos između intenziteta zračenja propuštenog kroz uzorak, odnosno eksperimentalno određene veličine, i koncentracije uzorka, fizikalne veličine koja se određuje računski. Opisana ovisnost definirana je izrazom: $\log \frac{I^0}{I} = A = \varepsilon \times c \times \ell$. Drugim riječima, vrijednost apsorbancije u UV/VIS spektru ovisi o koncentraciji otopine, duljini puta zrake kroz otopinu (standardna debljina kivete je 1 cm) i sposobnosti otopljenih molekula da apsorbiraju svjetlost, što je izraženo molarnim apsorpcijskim koeficijentom, ε (Strelec, 2009). Poznavanjem vrijednosti ε određene otopine, pomoću izmjerene apsorbancije moguće je odrediti koncentraciju. Iako Beer – Lambertov zakon pokazuje ograničenja i primjenjuje se prvenstveno na beskonačno razrijeđene otopine, onda kada postoji linearan odnos između A i c , u praksi je široko zastupljen i dovoljno točan za primjenu na nizu otopina različitih koncentracija pa se koristi, primjerice, u određivanju koncentracije nukleinskih kiselina i proteina (Trumbo i sur., 2013).

Za uspješnost spektrofotometrijskog mjerenja potrebno je odrediti valnu duljinu svjetlosti koju otopina najviše apsorbira, jer je to valna duljina na kojoj će se provoditi mjerenja. U tu svrhu potrebno je snimiti apsorpcijski spektar, odnosno izmjeriti apsorbanciju uzorka za niz valnih duljina i prikazati ju grafički. Na os ordinate nanosi se apsorbancija, a na os apscise zadana valna duljina. Ona valna duljina koja odgovara apsorpcijskom maksimumu na dobivenoj spektrofotometrijskoj krivulji predstavlja svjetlost valne duljine kojom se postiže najveća osjetljivost mjerenja pa se na toj valnoj duljini provode mjerenja (Pitinac i Pecikozić, 2016). Apsorpcijski spektar može imati i više apsorpcijskih maksimuma, a oni odgovaraju elektronskim prijelazima iz osnovnog u pobuđeno stanje. Zatim slijedi odabir odgovarajuće lampe i kiveta, ovisno o tome radi li se o UV ili VIS području. Za mjerenja u VIS području uglavnom se koriste plastične kivete (polipropilen, polistiren, PMMA) ili po potrebi kivete od optičkog stakla, odnosno materijala koji osigurava prozirnost kivete u VIS području, dok za UV područje (<300 nm) kivete od kvarcnog (silikatnog) stakla ili prikladne plastike koja osigurava prozirnost kivete u UV

području. U spektrofotometrijskim mjerenjima ključan je odabir odgovarajuće kivete, a informacije o različitim tipovima kiveta mogu se dobiti od proizvođača. Primjerice, kivete napravljene od polistirena relativno su jeftine i koriste se pri mjerenjima iznad 340 nm, dok je za mjerenja iznad 300 nm poželjno koristiti PMMA kivete. Plastične UV kivete zamjenjuju skupe kvarcne kivete i izvrsne su za određivanje koncentracije DNA, RNA i proteina u rasponu valnih duljina 230 – 900 nm.

Prije početka mjerenja potrebno je pripremiti sav materijal i pribor, a većinom su to: automatske pipete različitih kapaciteta i odgovarajući nastavci za pipete, otopine za pripremu reakcijske smjese prema protokolu koji se koristi, posuda s ledom u kojoj se (u većini slučajeva) drže uzorci, vodena kupelj za održavanje temperature otopina ili inkubaciju reakcijske smjese i boca štrcaljka za ispiranje kiveta napunjena destiliranom vodom. Prije početka rada neophodno je znati što će se mjeriti i kakav se rezultat očekuje. Preciznost mjerenja osigurava se točno definiranim količinama pojedine komponente koja se dodaje u reakcijsku smjesu i zato je važno imati pripremljen protokol s potrebnim informacijama. Isto tako, važno je na vrijeme pripremiti spektrofotometar. Izuzev starijih i jednostavnih modela, uz većinu danas dostupnih spektrofotometrijskih uređaja dolazi instalacijski paket za računalni program (softver) pomoću kojeg se instrument povezuje s računalom. Da bi se započelo s mjerenjem, spektrofotometar se treba povezati s programom na računalu u kojem se odabire odgovarajuća metoda u ovisnosti o tome kakva se analiza planira provesti. Ovisno u proizvođaču, softveri se mogu razlikovati s obzirom na opseg metoda koje podržavaju. Većina programa omogućuje spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije u širokom rasponu valnih duljina (pri jednoj ili više valnih duljina istovremeno), kvantitativno mjerenje, kinetička mjerenja i skeniranje cijelog spektra. Primjerice, ako je cilj odrediti koncentraciju ili prisutnost neke biološke molekule u uzorku (proteina, nukleinskih kiselina, biljnih pigmenata, fenola, produkata lipidne peroksidacije, reaktivnih kisikovih jedinica i sl.) potrebno je u programu odabrati modul kojim se omogućuje mjerenje pri jednoj ili više valnih duljina i podesiti valnu duljinu pri kojoj određena molekula apsorbira elektromagnetsko zračenje. Ako je u cilju istraživanja pratiti kinetiku enzimske katalizirane reakcije, tada se odabire modul u kojem se zadaje ukupno vrijeme mjerenja i vremenski interval u kojem želimo da uređaj bilježi podatke (Slika 7 a). Na samom početku rada potrebno je nivelirati spektrofotometar, odnosno postaviti nultu apsorbanciju kako bi instrument poništio pozadinsko zračenje i točno prikazao vrijednosti uzorka, a kao referenca se uglavnom koristi destilirana voda. Isto tako, na početku mjerenja važno je napraviti i slijepu probu, a to je postupak određivanja koji slijedi sve korake analize, ali u odsutnosti uzorka (Strelec, 2009). Koristi se za detekciju i kompenzaciju sustavnih pogrešaka u analizi, u kojima je ljudski faktor odgovoran za stvaranje pogrešaka. Vrijednost slijepe probe oduzima se od vrijednosti izmjerenih za svaki uzorak. Ostali uobičajeni izvori pogrešaka uključuju upotrebu prljavih kiveta, slabo pomiješanih otopina, loših tehnika pipetiranja i pogrešno odabranog izvora svjetlosti ili valne duljine. Ove pogreške mogu se izbjeći, stoga je važno misliti na dobru radnu praksu. Metoda spektrofotometrijskog određivanja, uz mjerenje apsorbancije uzoraka nepoznate koncentracije, podrazumijeva i mjerenje apsorbancije otopina poznatih koncentracija koje će poslužiti za izradu baždarnog dijagrama. Primjer izgleda spektrofotometrijske krivulje dobivene praćenjem kinetike jedne enzimske katalizirane reakcije prikazan je na Slici 7 a), dok je izrada baždarnog dijagrama prikazana na Slici 7 b). Baždarni dijagram prikazuje ovisnost apsorbancije otopine o zadanoj koncentraciji molekula u otopini i temelji se na Beer-Lambertovom zakonu. Za izradu baždarnog dijagrama priprema se niz serijskih razrjeđenja otopina standardnog proteina poznate koncentracije. Linearizirani baždarni dijagram na Slici 7 b) prikazuje ovisnost intenziteta apsorbancije o količini (koncentraciji) proteina u otopini, a poslužio je za preračunavanje vrijednosti apsorbancije izmjerene u uzorcima u količinu proteina pomoću jednadžbe

pravca. Prilikom planiranja eksperimenta poželjno je proučiti nekoliko protokola za parametre koji se planiraju mjeriti, kako bi se prilikom uhodavanja metode izdvojila ona optimalna.



Slika 5 a) Rezultat mjerenja spektrofotometrom je spektrofotometrijska krivulja, u ovom slučaju nastala tijekom praćenja kinetike reakcije, koja ukazuje na pad apsorbancije u uzorku u ovisnosti o vremenu; b) Analizi podataka dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem prethodi izrada baždarnog dijagrama, koji se linearizira i izražava pomoću jednadžbe pravca, kojom se izmjerena apsorbancija otopine nepoznate koncentracije uzorka preračunava u koncentraciju ili količinu tvari prisutne u otopini.

IMPLEMENTACIJA SPEKTROFOTOMETRIJE U NASTAVU

Budući da je jedan od odgojno-obrazovnih ciljeva poučavanja Biologije „razviti istraživačke kompetencije temeljene na znanstvenim principima i odgovornost pri korištenju rezultatima radi donošenja zaključaka i odluka povezanih sa svakodnevnim životom“ (MZO, 2019), učenicima treba omogućiti sudjelovanje u inovativnim metodama poučavanja i samostalno korištenje dostupne laboratorijske opreme. Spektrofotometar se, ovisno o predmetu i cilju nastavnog sata, može koristiti kao nastavno sredstvo ili pomagalo. U nastavi Biologije, implementaciju je moguće provesti iskustvenim i istraživačkim učenjem unutar makrokoncepta prirodosnanstveni pristup u integraciji s ostalim ishodima učenja po razredima (npr. OŠ A.7.2., OŠ B.8.1., SŠ B.1.2., SŠ B.1.3., SŠ B.2.1., SŠ B.3.1., SŠ A.4.1.), kao i provođenjem projekata. Na temelju usvojenih znanja i proučavanja literature, učenici mogu samostalno ili uz pomoć nastavnika (ovisno o propisanim ishodima i stupnju samostalnosti i iskustva rada istraživačkim učenjem) predložiti nacrt istraživanja u kojemu će spektrofotometrijski mjeriti određene parametre na modelnim organizmima. To može biti istraživanje odgovora biljaka ili životinja na različite podražaje i utjecaje životnih uvjeta okoliša (npr. abiotički čimbenici) i povezivanje s antropogenim utjecajem. Primjerice, učenici mogu provesti istraživanje na biljkama koje zasade u školskom vrtu ili u učionici, a parametri koje mogu jednostavno izmjeriti su količina fotosintetskih pigmenata, koncentracija proteina i nukleinskih kiselina ili aktivnost antioksidacijskih enzima za koje nisu potrebne skupe kemikalije (npr. katalaza i gvajakol-peroksidaza). Spektrofotometrija se u školama često koristi i u nastavi kemije pa je moguće ostvariti kvalitetnu suradnju i planirati interdisciplinarne projekte na razini škole. S nastavnikom kemije učenici mogu pratiti i stupanj zagađenja voda u školskom okolišu ili okolnim mjestima, pri čemu mogu mjeriti koncentracije fenola, dušika u obliku amonijevih iona, nitrata i nitrita, fosfora u obliku ortofosfata te koncentraciju željeza (Pitinac i Pecikozić, 2016). Isto tako, posjedovanjem spektrofotometra otvara se mogućnost korištenja dobivenih podataka u ozbiljnijim istraživanjima, što je vrlo korisno ako je škola, primjerice, sudionik u GLOBE programu pa je moguće provoditi puno složenija mjerenja i dobiti relevantne podatke.

Spektrofotometri su općenito slabo zastupljeni u školskim laboratorijima (Lema i sur., 2002), a naročito u Hrvatskoj. Isto vrijedi i za kemikalije koje se uobičajeno koriste u spektrofotometrijskim mjerenjima, a razlog tome je uglavnom nedostatak financijskih sredstava za pokrivanje troškova nabave koji su viši

u odnosu na uobičajeno korištene instrumente i kemikalije. Navedeni troškovi vjerojatno će obeshrabrili nastavnike biologije koji bi željeli osuvremeniti školski laboratorij. Stoga, cilj je na tržištu pronaći jednostavan, prenosiv i jeftin spektrofotometar ili potražiti alternativna rješenja poput donacija, nabave uređaja putem raspisanih natječaja i pisanjem projekata, posudbe ili ostvarivanja suradnje s visokoobrazovnim ustanovama. Ako je škola ograničena financijskim sredstvima, jeftinije alternativno rješenje je sastaviti vlastiti spektrofotometar kroz projektnu nastavu i suradnju više razrednih odjela i nastavnika. Učenici bi kroz ovakav način rada bili aktivno uključeni u vlastiti proces učenja i sudjelovali u njegovu kreiranju, ali i razvijali svijest o važnosti suradništva i rada u timu, što postavlja dobre temelje za češću upotrebu suradničkih oblika učenja. Ako se nastavnik odluči za posljednju opciju, prijedlog je uspostaviti suradnju s nastavnicima fizike i kemije te osmisliti interdisciplinarni učenički ili školski projekt. Uz sastavljanje spektrofotometra, učenici bi na temelju vlastitog iskustva učili o principu rada spektrofotometra, počevši od stvaranja fotona svjetlosti i ekscitacije elektrona do pojave praznina u spektru boja. Osim toga, suvremeni laboratorijski instrumenti (osobito spektrofotometri) često se promatraju samo kao zatvorene kutije čiji su osnovni dijelovi učenicima nedostupni (Bouza i sur., 2019). Iz tog razloga, prijedlog je da eksperimenti koji se planiraju provesti u nastavi budu osmišljeni kroz integraciju tradicionalnih metoda i suvremene tehnologije, kako bi se izbjeglo oslanjanje na tehnologiju bez razmišljanja o temeljnim principima rada instrumenata koji se koriste. Isto tako, ako je nastavnicima u cilju smanjiti pasivnost učenika i potaknuti razvoj prirodoslovne pismenosti, tada je potrebno motivirati učenike na analizu prikupljenih podataka i njihovu obradu, pri čemu su od osobite važnosti interdisciplinarni podaci, odnosno povezivanje nastavnih sadržaja biologije, kemije, geografije i fizike, ali prema potrebi i predmeta društvenog ili tehničkog područja. Primjerice, učenici mogu uz mentorstvo nastavnika fizike i kemije konstruirati jednostavni spektrofotometar, a koristiti ga u eksperimentima s nastavnicima biologije i kemije. Projekt ovakvog tipa omogućit će učenicima vizualizaciju osnovnih dijelova i principa rada spektrofotometra te povezivanje zapažanja na makroskopskoj razini (primjerice, boje uzorka) sa simboličnim prikazima dobivenim po završetku mjerenja (spektrofotometrijska krivulja) i pridonijeti razvoju konceptualnog razmišljanja i razumijevanja. Isto tako, osim slaganja uređaja prema predloženim komponentama, učenicima se može dati mogućnost primjene vlastitih inovativnih ideja i kreativnih rješenja, tj. korištenja komponenti prema vlastitom odabiru u svrhu poboljšanja performansi uređaja. Premda samostalno konstruirani spektrofotometri često nisu ni točni ni precizni kao oni komercijalni, u obrazovne svrhe često je poželjno žrtvovati navedeni nedostatak u korist jednostavnosti i smanjenja troškova. K tome, jasno uočljiva ograničenja postaju osnova boljem razumijevanju same metode, budući da je obrazovna vrijednost u ovom slučaju povezana s izgradnjom funkcionalnog instrumenta u cjelini, razumijevanju principa rada i primjene istog (Albert i sur., 2012; Scheeline, 2010).

Primjeri dobre prakse – kako iskoristiti spektrofotometar u nastavi?

Samostalnim radom u laboratoriju učenici stječu znanje i vještine primjenjive u svakodnevnom životu te iskustvo koje će im pomoći po završetku srednjoškolskog obrazovanja, prilikom upisivanja željenog studija prirodoslovnog područja. Pretražujući literaturu mogu se pronaći brojni primjeri dobre prakse za implementaciju spektrofotometrije u nastavu. Granger (2004) je u svom radu dao pregled eksperimenata koji se mogu provoditi po predmetima ili interdisciplinarno, a predviđeni su za učenike u dobi od 11 do 18 godina. Neki od ciljeva provedenih istraživanja bili su otkriti odnos između boje otopine i izmjerene valne duljine, odrediti apsorpcijske maksimume pH puferima koji se koriste za kalibraciju, ekstrakcija pigmenata iz biljaka i mjerenje apsorpcijskog spektra, određivanje kvalitete vode mjerenjem koncentracije nitrata i fosfata, ispitivanje procesa fotosinteze i protoka energije, određivanje koncentracije hemoglobina u animalnom tkiva, izrada baždarnih krivulja i usporedba

performansi dvaju spektrofotometara. Dooling i sur. (2013) osmislili su zanimljivi projekt u kojem su učenici spektrofotometrijski određivali koncentraciju kofeina i sadržaj vode u sirovim i prženim zrnima kave pribavljenim iz različitih dijelova svijeta, a cilj je bio identificirati zemlju porijekla svakog uzorka. Nastavnici su u ulozi moderatora priskrbili potreban materijal i pribor te svoju podršku ostvarili i kroz poučavanje temeljnim konceptima. Učenici su do kraja eksperimenta produbili razumijevanje masenog udjela, molarnosti, razrjeđivanja otopina i odnosa između apsorbancije i koncentracije u Beer – Lambertovom zakonu. Kroz istraživačko učenje prikupili su eksperimentalne podatke, izveli kvantitativnu analizu i predvidjeli porijeklo svog uzorka. O’Donoghue (2019) u svom je radu opisao dizajniranje, izradu i ispitivanje rada jednostavnog LCD-LDR kolorimetra u usporedbi s komercijalnim spektrofotometrom. Predstavio je izradu baždarne krivulje potrebne za mjerenje koncentracije salicilne kiseline u uzorcima komercijalnih sredstava za čišćenje lica. Primjenom Beer-Lambertova zakona učenici su izradili baždarne dijagrame i izračunali koncentracije salicilne kiseline u uzorcima. Autor povezuje implementaciju spektrofotometrije u nižim razredima osnovne škole s razvojem fine motorike, budući da su učenici u dobi od 5 do 7 godina u početku naišli na poteškoće pri korištenju pipete, ali već pri mjerenju trećeg uzorka većina ih je uspješno savladala ovu vještinu i opisala pipetiranje kao jednu od najzanimljivijih dijelova eksperimenta. Važno je voditi računa o tome da je aktivnost u kojoj je planirano korištenje spektrofotometra usmjerena na učenike, koji će biti aktivni sudionici u nastavi, a da je hodogram istraživanja prilagođen njihovoj dobi, potrebama i interesima, kako bi se izbjegla prevelika uključenost nastavnika, a postigao razvoj vještina i znanja na višim kognitivnim razinama.

ZAKLJUČAK I METODIČKI ZNAČAJ

Suvremene metode i oblici poučavanja prirodoslovnih predmeta naglasak stavljaju na aktivno sudjelovanje učenika u istraživačkim aktivnostima, čime se potiče istraživačko učenje i razvija prirodoslovna pismenost, koja se očituje razvojem vještina u znanstvenom rasuđivanju, konceptualnim razumijevanjem znanstvenih spoznaja i razvojem kreativnosti. Slijedi da je svrha praktičnog rada u laboratoriju stjecanje iskustva i razvoj područno specifičnih i generičkih kompetencija koje uvode učenike u znanstveni način razmišljanja neophodan u svakodnevnom životu, obrazovanju i budućem radu. U tom kontekstu, spektrofotometrija, kao široko zastupljena instrumentalna metoda, ima veliki potencijal u podizanju kvalitete poučavanja nastavnih predmeta prirodoslovnog područja i otvara mogućnost kreativnog izražavanja učenika. Ako škola na raspolaganju ima ovakav instrument, u mogućnosti je planirati različite istraživačke projekte, dobivene podatke koristiti za ozbiljnija istraživanja i ostvarivati suradnju s drugim školama i visokoškolskim ustanovama. S obzirom na to da je biologija, kao dio prirodoslovnoga područja, osnovnim konceptima usko povezana s kemijom, fizikom, geografijom i međupredmetnim temama, investiranjem u spektrofotometar otvaraju se brojne mogućnosti interdisciplinarnе suradnje na razini škole. Prema tome, poučavanje koje se temelji na inovativnim metodama i novim tehnologijama pridonosi povećanju interesa za prirodoslovlje i znanstvena istraživanja te olakšava snalaženje u budućim poslovnim izazovima i prepoznavanje aktualnih problema, kritičko promišljanje i uključivanje u rješavanje istih. Implementacija spektrofotometrije u nastavu obogatit će njen sadržaj, otvoriti vrata novim mogućnostima, a potencijalno i motivirati učenike za odabir studija iz područja prirodnih znanosti.

LITERATURA

- Albert, D. R., Todt, M. A., Davis, H. F. (2012). A Low-Cost Quantitative Absorption Spectrophotometer. *Journal of Chemical Education*, 89, 1432–1435.
- Atkins, P. W., Clugston, M. J. (1989) *Načela fizikalne kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1989.

- Burgess, C. (2017). The Basis for Good Spectrophotometric UV–Visible Measurements. *UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*, 1–35.
- Balažinec, M., Radanović, I., Sertić Perić, M. (2020). Utjecaj zainteresiranosti i nepoticanog samoreguliranog učenja na krajnji ishod učenja građe i svojstva tla. *Educatio biologiae*, 6, 46-64.
- Bognar, L., Matijević, M. (2005.) *Didaktika* (treće izmijenjeno izdanje). Zagreb, Školska knjiga
- Bouza, M. E., Nastou, A., Panigyraki, C., Makedonas, C. (2019). Introducing spectrophotometry in the school lab employing LEGO bricks and LEDs. *Chemistry Teacher International*, 0(0).
- Braš Roth, M., Markočić Dekanić, A., Markuš Sandrić, M. (2017). PISA 2015. Prirodoslovne kompetencije za život. NCVVO, Zagreb.
- Domazet, M. (2007). Prirodoslovlje u kurikulumu za obvezno obrazovanje. *Metodika* 15, 8, 494-510.
- Dooling, K., Bodenstedt, K., Page, M. F. Z. (2013) A Caffeinated Boost on UV Spectrophotometry: A Lab for High School Chemistry or an Introductory University Chemistry Course. *Journal of Chemical Education*, 90, 914–917.
- European Commission (2007): EUR22845 - Science Education NOW: A renewed Pedagogy for the Future of Europe. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Implen, dostupno na: <https://www.implen.de/product-page/implen-nanophotometer-np80-microvolume-cuvette-spectrophotometer/>, pristupljeno: 30.9.2021.
- Garašić, D., Radanović, I., Lukša, Ž. (2018). Osvrt na aktualne nastavne programe učenja biologije. *Napredak*, 159, 159-178.
- Germer, T. A., Zwinkels, J. C., Tsai, B. K. (2014). Theoretical Concepts in Spectrophotometric Measurements. *Spectrophotometry - Accurate Measurement of Optical Properties of Materials*, 11–66.
- Granger, J. N. (2004). Introducing Spectrophotometry in Grades 6 –12 Using a College-Based Spectrophotometer Loan Program. *Spectroscopy letters*, 37, 159–171.
- Hach Company, 1996, 1997, 1998, 1999, DR/2010 spectrophotometer instrument manual. Dostupno na: <https://www.rsmanuals.com/3430/hach-dr-2010/page-1/>, pristupljeno: 30. 9. 2021.
- Labak, I., Heffer, M., Radanović, I. (2014). Stavovi učenika i učitelja o nastavi prirode i biologije organiziranoj u dvosatu. *Educatio biologiae*, 1, 36-48.
- Lema, A., Aljinovic, E. M., Lozano, M.E. (2002). Using a Homemade Spectrophotometer in Teaching Biosciences. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30, 106–10.
- Maltar Okun, T. (2019) Uloga stavova učenika prema prirodoslovnim predmetima u objašnjavanju obrazovnog postignuća i namjere upisa u srednju školu. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Učiteljski fakultet u Zagrebu.
- Mihoci, M. (2015). Osvrti: Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 64, 683-685.
- Morris, R. (2015). Spectrophotometry. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 2.1.1–2.1.30.
- MZO - Ministarstvo znanosti i obrazovanja (2019), Odluka o donošenju kurikuluma za nastavni predmet biologije za osnovne škole i gimnazije u Republici Hrvatskoj, Zagreb: Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta RH. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_7_149.html, pristupljeno: 23.11.2021.
- O'Donoghue, J. (2019). Simplified Low-Cost Colorimetry for Education and Public Engagement. *Journal of Chemical Education*, 96, 1136–1142.
- Pitinac, N., Pecikozić, Đ. (2016). Priručnik za instrumentalne metode ispitivanja sastavnica okoliša u strukovnim školama. Osijek, Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijeku.
- PerkinElmer, 2002-2011, Brochure – LAMBDA 25/35/45, UV/Vis Spectrophotometers. Dostupno na: https://www.perkinelmer.com/cmsresources/images/44-74448bro_lambda.pdf, pristupljeno: 30.9.2021.
- Podrug, I. (2017). Mogućnosti primjene mobilnih aplikacija u nastavi prirode i biologije. *Educatio biologiae*, 3, 165-176.
- Pranjić, Marko. (2005). *Didaktika*. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga – Hrvatski studiji Sveučilišta u Zagrebu.
- Previšić, V. (2007). Kurikulum: teorije, metodologija, sadržaj, struktura. Zagreb: Školska knjiga.
- Scheeline, A. (2010). Teaching, Learning, and Using Spectroscopy with Commercial, Off-the-Shelf Technology. *Applied Spectroscopy*, 64, 256A-268A.
- Simon, U. K., Steindl, H., Larcher, N., Kulac, H., Hotter, A. (2016). Young science journalism: writing popular scientific articles may contribute to an increase of high-school students' interest in the natural sciences. *International Journal of Science Education*, 38, 814–841.
- Strelec, I. (ur.) (2009) *Praktikum iz Biokemije*. Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. TECAN, dostupno na: <https://www.tecan.com/blog/spark-multimode-microplate-reader-for-high-performance-cell-based-fluorescence-assays>, pristupljeno: 30.9.2021.
- Tot, D. (2010). Učeničke kompetencije i suvremena nastava. *Odgojne znanosti*, 12, 65-78.
- Trumbo, T. A., Schultz, E., Borland, M. G., Pugh, M. E. (2013). Applied spectrophotometry: Analysis of a biochemical mixture. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 41, 242–250.
- Tytler, R., Osborne, J. (2012). Student Attitudes and Aspirations Towards Science. In: Fraser B., Tobin K., McRobbie C. (eds) *Second International Handbook of Science Education* (str. 597–625). Springer International Handbooks of Education, vol 24. Springer, Dordrecht.
- Zidar, L., Begić, V., Bastić, M., Radanović, I. (2018). Razumijevanje koncepata ravnoteže i međuovisnosti kod učenika u dobi od 13 godina. *Educatio biologiae*, 4, 35-51.

Application of spectrophotometry in the teaching of biology and other subjects of the natural sciences

Nikolina Sabo

Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University in Osijek, Car Hadrijan Street 8/A, 31000 Osijek, Croatia

nsabo@biologija.unios.hr

ABSTRACT

The rapid changes in a society characterized by constantly new scientific knowledge require a constant change of paradigm for the teaching and learning of biology, as well as other teaching subjects. Therefore, active learning is inevitable, which requires the application of research skills, collaborative learning and creative expression. Numerous instrumental methods are used in scientific research in the field of natural sciences, of which spectrophotometry is one of the fundamental analytical techniques for qualitative and quantitative analysis. In addition to its application for scientific research purposes, spectrophotometry is gradually being applied in schools and is an increasingly common research topic in science education. The aim is to find a simple, portable, and inexpensive spectrophotometer for laboratory activities in schools or to find ideal components for *homemade* instruments to make spectrophotometric methods accessible to students in schools with limited resources. There are numerous examples of good practice that demonstrate how a spectrophotometer can be used in the classroom as it has potential for conceptual understanding. Teaching based on innovative methods and new technologies increases students' interest in science and motivates them to engage in independent activities that enable better acquisition and understanding of the subject matter and application of the acquired knowledge and problem-solving skills, which is an important step in preparing young people for responsible life in modern society.

Keywords: *inquiry based learning; scientific approach; active learning*