

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Madu

2.1.1. Pengertian Madu

Menurut SNI 3545:2013 madu merupakan cairan yang memiliki rasa manis dan dihasilkan oleh lebah madu (*Apis Sp*) dari sari bunga tanaman (*floral nektar*) atau bagian lain dari tanaman (*extra floral*). Madu merupakan salah satu bahan pangan yang memiliki rasa manis dan kental yang berwarna emas sampai coklat gelap dengan kandungan gula yang tinggi serta rendah lemak. Madu diperoleh dengan proses enzimatik oleh lebah melalui nektar bunga dan digunakan sebagai cadangan makanan (White, 1978:286).

Peran madu sebagai obat sudah diketahui puluhan tahun yang lalu. Menurut Bogdanov dkk (2008:677) menyatakan bahwa sekitar tahun 2000 SM, madu sudah digunakan sebagai salep dan obat infeksi. Selain mempertahankan metabolisme tubuh Sarwono (2001:78) menyatakan bahwa salah satu fungsi madu adalah sebagai antibiotik. Madu juga bisa mempertahankan strukturnya dari mikroorganisme perusak karena di dalam madu terdapat tekanan osmotik sehingga madu dapat disimpan dalam waktu yang lama.

2.1.2. Kandungan Madu

Madu dapat dikelompokkan berdasarkan asal polennya menjadi madu NP (*natural pollen*) dan madu PS (*pollen substitute*). Madu NP atau yang sering disebut madu alami umumnya tersusun atas 17,1% air, 82,4% karbohidrat (38% fruktosa, 31% glukosa, 12,9% gula lain), 0,5% protein, asam amino, senyawa fenolik, vitamin, asam organik dan berbagai mineral. Menurut Sarwono

(2001:69), dari 100 gr madu mengandung 294 kalori, 9,5 gr karbohidrat, 24 gr air, 16 gr fosfor, 5 gr kalsium, dan 4 gr vitamin C.

Berdasarkan SNI 3545:2013 madu memiliki persyaratan mutu, dapat dilihat pada Tabel 1 dan pada Tabel 2. dapat dilihat kandungan nutrisi pada madu secara umum.

Tabel 1. Persyaratan Mutu Madu

No	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
A	Uji Organoleptik		
1	Bau		Khas Madu
2	Rasa		Khas Madu
B	Uji Laboratoris		
1	Aktivitas Enzim Dia stase	DN	Min 3 ^{*)}
2	Hidroksimetilfurfural (HMF)	mg/kg	Maks 50
3	Kadar Air	% b/b	Maks 22
4	Gula Pereduksi (dihitung sebagai glukosa)	% b/b	Min 65
5	Sukrosa	% b/b	Maks 5
6	Keasaman	ml NaOH/Kg	Maks 50
7	Padatan tak larut dalam air	% b/b	Maks 0,5
8	Abu	% b/b	Maks 0,5
9	Cemaran Logam		
	9.1 Timbal (Pb)	mg/kg	Maks 2,0
	9.2 Cadmium (Cd)	mg/kg	Maks 0,2
	9.3 Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks 0,03
10	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks 1,0
11	Kloramfenikol		Tidak Terdeteksi
12	Cemaran Mikroba		
	12.1 Angka Lempeng Total (ALT)	Koloni/g	< 5x10 ³
	12.2. Angka Paling Mungkin (APM) koliform	APM/g	< 3
	12.3 Kapang dan khamir	Koloni/g	< 1x10 ¹

CATATAN *) Persyaratan ini berdasarkan pengujian setelah madu dipanen

(Sumber : SNI 3545:2013)

Tabel 2. Kandungan Nutrisi Madu

Komposisi	Jumlah
Gula	82,12 g
Energi	304 kcal
Karbohidrat	82,4 g
Lemak	0 g
Protein	0,3 g
Asam Pantotenat (Vit. B5)	0,068 mg
Vitamin B6	0,024 mg
Folat (Vit. B9)	2 g
Air	17,1 g
Riboflavin (Vit. B2)	0,038 mg
Niacin (Vit. B3)	0,121 mg
Fosfor	4,0 mg
Potasium	52 mg
Vitamin C	0,5 mg
Kalsium	6 mg
Besi	0,42 mg
Magnesium	2 mg
Sodium	4 mg
Zinc	0,22 mg

(Sumber: Anonim. 2013)

2.1.3. Manfaat dan Jenis Madu Berdasarkan Sumbernya

2.1.3.1. Manfaat Madu

Dalam bidang pengobatan, penelitian terhadap madu sudah dilakukan dan terbukti efektif. Madu efektif untuk pengobatan luka, perawatan penyakit saluran pencernaan pada manusia, penyembuhan luka bakar, dan sebagai antibakteri (Jull dkk. 2008:175). Madu dengan rasanya yang manis menurut Nemoseck dkk. (2011:56) madu dapat digunakan sebagai pengganti gula yang menurunkan resiko terjadinya penyakit kardiovaskular. Pendapat yang sama juga diungkapkan oleh Yaghoobi dkk. (2008:464) bahwa madu dapat menurunkan kadar LDL dan meningkatkan kadar HDL dalam darah.

Mutu, rasa, aroma, dan komposisi kimia suatu madu sangat bergantung pada kondisi lingkungan dan iklim habitat lebah madu hidup, serta diet makanan lebah tersebut (Kartini 1986: 143) karena apabila lebah mengalami diet makanan serta

iklim habitatnya kurang baik akan mempengaruhi jumlah madu yang diproduksi. Serbuk sari (*pollen*) merupakan bahan makanan pokok dan sumber protein alami lebah madu. Kandungan serbuk sari secara umum terdiri atas abu dengan berbagai macam mineral (1,8-3,7%), karbohidrat (13-37%), serat (5,3%), protein (6-28%), dan lemak (1,2-3,7%) (Kuntadi 2008: 367).

2.1.3.2. Jenis-jenis Madu

a) Madu hutan

Hutan yang terdiri dari berbagai tanaman akan mempengaruhi lebah untuk mengambil nektar dari beberapa bunga sehingga madu hutan biasanya dihasilkan dari nektar multiflora, yaitu tidak hanya dikhususkan satu tanaman saja. Misalnya madu dari Sumatera biasanya cenderung lebih gelap, agak encer, banyak mengandung *bee pollen*, dan rasanya agak asam. Madu dari Kalimantan biasanya warnanya lebih terang, lebih kental, dan rasa manisnya biasa.

Khasiat madu hutan :

- Membantu mengobati anemia dan darah rendah
- Membantu meningkatkan stamina dan kekebalan tubuh
- Mengobati luka bakar
- Mengobati rematik
- Meningkatkan nafsu makan

b) Madu Randu

Madu randu diambil dari nektar bunga pohon randu, umumnya memiliki aroma randu yang khas serta rasanya yang manis sedikit asam, warnanya coklat terang, hal ini dipengaruhi oleh keadaan iklim di sekitar pohon randu tersebut. Dalam madu randu banyak *bee pollen* dan *royal*

jelly-nya. Madu ini sangat dianjurkan untuk bayi dan balita karena tidak terlalu panas di perut.

Khasiat madu randu adalah :

- Mengobati pilek, batuk, dan demam
- Meningkatkan nafsu makan anak
- Membantu meningkatkan kecerdasan otak
- Mengobati penyakit atau gangguan kesehatan mulut

c) Madu Kaliandra

Madu Kaliandra diperoleh dari sari nektar bunga kaliandra, biasanya dikenal dengan madu kuning karena warnanya cenderung kuning dan rasa manisnya khas. Jumlah madu yang diperoleh akan dipengaruhi oleh kondisi bunga tersebut.

Khasiat madu kaliandra adalah :

- Membantu pengobatan hipertensi
- Meningkatkan produksi hormon
- Melancarkan fungsi saluran pencernaan
- Membantu proses pengobatan kanker
- Mengatasi insomnia

d) Madu Karet

Madu karet diambil dari nektar bunga karet oleh lebah yang biasanya ditenakkan di sekitar hutan karet. Madu karet ini memiliki ciri khas yaitu mudah mengkristal karena dalam madu karet terdapat banyak enzim diastase.

Khasiat madu karet adalah :

- Membantu mengatasi keputihan
- Mengobati alergi dan gatal-gatal
- Meningkatkan imunitas dan vitalitas tubuh
- Mengobati luka bakar

e) Madu Manuka

Madu manuka adalah madu yang diambil dari nektar bunga manuka (*Leptospermum scoparium*), yaitu sejenis pohon teh yang tumbuh di dataran Selandia Baru. Madu manuka memiliki warna gelap dan cita rasanya khas, karena madu manuka ini diambil dari daerah yang bebas polusi di Selandia Baru, maka kualitas madu ini pun menjadi yang terbaik dari madu jenis lain. Bahkan saat ini, madu manuka menjadi madu yang paling populer dengan sifat anti bakterinya yang sangat tinggi.

Khasiat madu manuka adalah :

- Menurunkan demam dan meredakan flu
- Mengobati infeksi
- Mengobati radang
- Mengobati gangguan pencernaan

f) Madu Kelengkeng

Madu kelengkeng diperoleh dari sari bunga kelengkeng. Madu ini memiliki warna coklat cerah agak kuning dan aroma khas seperti buah kelengkeng yang manis.

Khasiat madu kelengkeng adalah :

- Memperbaiki fungsi ginjal
- Meningkatkan imunitas

- Melancarkan buang air kecil
- Membantu proses pemulihan pasca operasi

g) Madu Rambutan

Madu ini diperoleh dari sari bunga rambutan yang diambil oleh lebah. Biasanya madu akan dikumpulkan pada salah satu batang kayu sehingga memudahkan pengambilan.

Khasiatnya adalah :

- Mengobati luka bakar
- Sangat baik dikonsumsi oleh ibu hamil
- Memperbaiki fungsi ginjal
- Mengobati sakit maag

h) Madu strawberry

Madu strawberry adalah madu yang dihasilkan dari nektar bunga strawberry di perkebunan bunga strawberry sehingga aromanya khas dan rasanya yang enak juga disukai oleh anak-anak.

Khasiat madu strawberry adalah :

- Meningkatkan daya tahan tubuh
- Memperbaiki fungsi otak
- Meningkatkan nafsu makan
- Meringankan insomnia

(Sumber : Anonim. 2013)

2.2. Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Enzim bekerja dengan urutan-urutan yang teratur, enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrient, reaksi yang menyimpan dan mengubah

energi kimiawi dan yang membuat makro molekul sel yaitu dari prekursor sederhana. Dalam proses metabolisme ada beberapa enzim yang dikenal sebagai enzim pengatur. Enzim pengatur dapat mengenali berbagai isyarat metabolisme dan mengubah kecepatan katalitiknya sesuai dengan isyarat yang diterima (Lehninger, 1982).

Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi dan mempercepat proses reaksi. Percepatan terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia setiap enzim yang bersifat tetap. Misalnya, enzim α -amilase hanya dapat digunakan pada proses perombakan pati menjadi glukosa.

Kerja enzim dipengaruhi beberapa faktor, terutama adalah substrat, suhu, derajat keasaman (pH), kofaktor, dan inhibitor. Tiap enzim memerlukan suhu dan pH optimum berbeda-beda karena enzim adalah protein yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan pH berubah. Di luar suhu atau pH yang sesuai, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan mengalami kerusakan. Hal ini akan menyebabkan enzim kehilangan fungsinya sama sekali. Kerja enzim juga dipengaruhi oleh kofaktor dan inhibitor.

Tiap-tiap enzim juga memiliki pH optimum, selain spesifikasi yang khas bagi substratnya. Enzim dapat terinaktivasi oleh modifikasi tidak dapat balik terhadap beberapa gugus fungsional yang penting bagi aktivitas katalitiknya. Enzim juga dapat dihambat secara balik oleh senyawa yang bersifat kompetitif atau non-kompetitif. Penghambat kompetitif yang strukturnya bisa menyerupai substrat, bersaing dengan substrat dapat berkaitan balik dengan sisi aktif, tetapi

penghambat ini tidak terubah oleh enzim. Penghambat kompetitif mengikat beberapa sisi lain baik pada enzim bebas maupun substrat enzim yang kompleks, kerja penghambat ini tidak dapat diatasi oleh substrat (Fersht, A; 1977).

Kerja enzim seperti halnya dengan katalisator dalam tubuh kita yaitu mempercepat suatu reaksi tetapi tidak ikut bereaksi. Tiap sel hidup mengandung ratusan enzim didalamnya. Tidak semua sel mengandung jumlah dan jenis enzim yang sama (Dwijoseputro, 1980).

Di dalam sel hidup, dihasilkan ribuan jenis enzim yang berfungsi untuk mengatur berbagai perubahan kimiawi yang berlangsung di dalamnya. Enzim tersebut diproduksi pada tempat, jumlah dan waktu yang tepat, dengan penggunaan energi yang minimum. Akibat dari fungsi enzim yang dapat mempercepat reaksi kimia, maka proses penguraian protein pada pencernaan manusia tidak membutuhkan waktu yang lama sampai bertahun-tahun. Melainkan hanya membutuhkan waktu kurang dari satu hari. Pengetahuan dan pemahaman akan enzim dan aktifitasnya dapat bermanfaat bagi kelancaran proses metabolisme tubuh. (Anonim. 2012)

2.2.1. Enzim Dalam Madu

Ada dua enzim yang berperan penting dalam madu yakni enzim diastase dan enzim invertase. Konsep enzim yang lama menggolongkan enzim amilase menjadi dua kelompok, kelompok pertama yakni α -amilase amiloklasik atau (amilitik) yang menceraikan rantai pati secara acak menjadi dekstrin dan menghasilkan hanya sedikit gula tereduksi. Kelompok kedua, β -amilase (sakharogenik) yang menceraikan gula tereduksi maltose dari ujung rantai pati. Derajat keasaman (pH) optimum bagi α -amilase berkisar antara 5,0 pada suhu

22- 30°C sampai 5,3 pada suhu 45-50°C, sedang untuk β -amilase adalah 5,3. Berdasarkan pengamatan pH optimum bagi diastase madu adalah 5,3. Pemanasan maupun penyimpanan lama terhadap madu mengakibatkan inaktivasi enzim madu dan data kinetik enzim madu telah diketahui sehingga paruh-hidupnya (*half-life*) dapat diketahui (Sihombing, 1997).

2.2.2. Enzim Diastase

Enzim diastase adalah enzim yang mengubah karbohidrat kompleks (polisakarida) menjadi karbohidrat yang sederhana (monosakarida)..

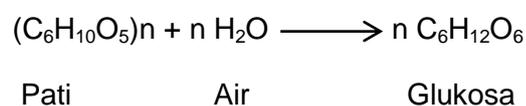
Lebah madu tidak dapat memanfaatkan pati mentah atau dekstrin. Sumber diastase dalam madu adalah lebah madu itu sendiri, meski ada juga yang menduga nektar sebagai sebagian sumbernya (Sihombing, 1997).

2.2.2.1. Fungsi Enzim Diastase

Enzim diastase pada madu dapat mengubah pati menjadi glukosa dengan menggunakan iodine yang disertai dengan perubahan warna larutan (Murdijati, 1992).

2.2.2.2. Reaksi Kimia Enzim Diastase

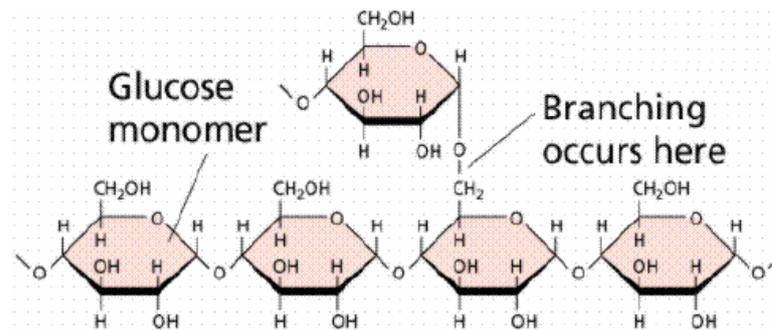
Hidrolisis pati dapat dilakukan oleh asam atau enzim. Jika pati dipanaskan dengan asam akan terurai menjadi molekul-molekul yang lebih kecil secara berurutan, dan hasil akhirnya adalah glukosa.



Ada beberapa tingkatan dalam reaksi diatas, yaitu molekul-molekul pati mula-mula pecah menjadi unit-unit rangkaian glukosa yang lebih pendek yang disebut dekstrin. Dekstrin ini dipecah lebih jauh menjadi maltosa (dua unit glukosa) dan akhirnya maltosa pecah menjadi glukosa (Murdijati, 1992).

Proses perubahan pati menjadi glukosa yang dilakukan oleh enzim diastase pada madu dalam uji aktivitas enzim dengan menggunakan iodine yang disertai perubahan warna larutannya adalah sebagai berikut :

Pati (biru) → dekstrin (biru kecoklatan) → akrodekstrin (coklat) → eritrodekstrin (merah) → Maltosa (kuning) → Glukosa (jernih/bening) + I₂ →



Gambar 2. Penambahan Amilum dengan Iodin

Larutan iodine digunakan untuk tes pati, warna biru tua menandai adanya larutan pati. Diperkirakan bahwa larutan iodine (ion I₃⁻ dan I₅⁻) tersubstitusi ke dalam pati, tersubstitusinya iodine setelah terputusnya ikatan glukosida dalam pati oleh enzim dan terurai menjadi molekul molekul lebih sederhana, maka makin banyak terbentuk gugus OH bebas yang dapat disubstitusi oleh iodine sehingga konsentrasi iodine dalam larutan makin kecil dan molekul air semakin banyak terbentuk, apabila pati terhidrolisis sempurna maka gugus iodine yang bakal diabsorpsi semakin banyak atau di pihak lain konsentrasi molekul air akan bertambah, semakin kecil konsentrasi iodine bebas maka larutan akan berubah menjadi jernih (Murdijati, 1992).

2.3. Spektrofotometri

2.3.1. Pengertian Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah sebuah metode analisis untuk mengukur konsentrasi suatu senyawa berdasarkan kemampuan senyawa tersebut

mengabsorpsi berkas sinar atau cahaya. Spektrofotometri adalah alat yang terdiri dari spektrofotometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu, sementara fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Istilah spektrofotometri berhubungan dengan pengukuran energi radiasi yang diserap oleh suatu sistem sebagai fungsi panjang gelombang dari radiasi maupun pengukuran panjang absorpsi terisolasi pada suatu panjang gelombang tertentu (Underwood, 1988).

Spektrofotometri adalah pengukuran kuantitatif dari intensitas radiasi elektromagnetik pada satu atau lebih panjang gelombang dengan suatu transduser (detektor). Spektrofotometri adalah analisis kuantitatif yang paling sering digunakan karena mempunyai sensitivitas yang baik yaitu 10^{-4} sampai 10^{-6} . Analisis jenis ini juga relatif selektif dan spesifik, ketepatannya cukup tinggi, relatif sederhana, dan murah.

2.3.2. Alat Yang Digunakan Pada Analisa Spektrofotometri

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer merupakan gabungan dari alat optik dan elektronika serta sifat-sifat kimia fisiknya. Dimana detector dapat mengukur intensitas cahaya yang dipancarkan secara tidak langsung cahaya yang diabsorpsi. Tiap media akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu tergantung pada senyawa atau warna yang terbentuk. (Ayu Pangestu, 2011)

2.3.2.1. Hukum Lambert-Beer

Berdasarkan hukum Lambert-Beer, rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang dihamburkan:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad \text{atau} \quad \%T = \frac{I_t}{I_0} \times 100\%$$

Dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0}$$

Dimana I_0 merupakan intensitas cahaya datang dan I_t atau I_1 adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel. Rumus yang diturunkan dari Hukum Beer dapat ditulis sebagai:

$$A = a \cdot b \cdot c \quad \text{Atau} \quad A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dimana:

A = Absorbansi

a = Tetapan absorbtivitas (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam ppm)

c = Konsentrasi larutan yang diukur

ϵ = Tetapan absorbtivitas molar (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam ppm)

b atau terkadang digunakan l = Tebal larutan (tebal kuvet diperhitungkan juga umumnya 1 cm)

Secara eksperimen hukum Lambert-beer akan terpenuhi apabila peralatan yang digunakan memenuhi kriteria-kriteria berikut:

- 1) Sinar yang masuk atau sinar yang mengenai sel sampel berupa sinar dengan dengan panjang gelombang tunggal (monokromatis).
- 2) Penyerapan sinar oleh suatu molekul yang ada di dalam larutan tidak dipengaruhi oleh molekul yang lain yang ada bersama dalam satu larutan.
- 3) Penyerapan terjadi di dalam volume larutan yang luas penampang (tebal kuvet) yang sama.

- 4) Penyerapan tidak menghasilkan pemancaran sinar pendafluor. Artinya larutan yang diukur harus benar-benar jernih agar tidak terjadi hamburan cahaya oleh partikel-partikel koloid atau suspensi yang ada di dalam larutan.
- 5) Konsentrasi analit rendah. Karena apabila konsentrasi tinggi akan mengganggu kelinearan grafik absorbansi versus konsentrasi.

Dalam menggunakan spektrofotometer harus mengetahui hubungan jenis warna cahaya dengan panjang gelombang, hal tersebut bisa dilihat pada Tabel 3. dan Tabel 4.

Tabel 3. Panjang gelombang untuk setiap jenis warna

Jenis Sinar	Panjang Gelombang (nm)
Ultraviolet	< 400
Violet	400-450
Biru	450-500
Hijau	500-570
Kuning	570-590
Oranye	590-620
Merah	620-760
Infra merah	>760

(Sumber : Analisa Kimia Kuantitatif,1986)

Tabel 4. Panjang gelombang berbagai warna cahaya

λ (nm)	Warna yang teradsorpsi	Warna tertransmisi (komplemen)
400-435	Violet	Hijau-Kuning
435-480	Biru	Kuning
480-490	Biru-Hijau	Oranye
490-500	Hijau-Biru	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Hijau-Kuning	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-650	Oranye	Biru-Hijau
650-760	Merah	Hijau-Biru

(Sumber : www.suharyo07.student.ipb.ac.id)

2.3.2.2. Jenis-jenis Spektrofotometer Berdasarkan Sumber Cahaya Yang Digunakan

1) Spektrofotometer Visible (Spektro Vis)

Pada spektrofotometer ini yang digunakan sebagai sumber sinar/energi adalah cahaya tampak (visible). Cahaya visible termasuk spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia. Panjang gelombang sinar tampak adalah 380 sampai 750 nm. Sehingga semua sinar yang dapat dilihat oleh kita, entah itu putih, merah, biru, hijau, apapun, selama ia dapat dilihat oleh mata, maka sinar tersebut termasuk ke dalam sinar tampak (visible). Sumber sinar tampak yang umumnya dipakai pada spektro visible adalah lampu Tungsten. Tungsten yang dikenal juga dengan nama Wolfram merupakan unsur kimia dengan simbol W dan no atom 74. Tungsten mempunyai titik didih yang tertinggi (3422 °C) dibanding logam lainnya. Karena sifat inilah maka ia digunakan sebagai sumber lampu. Sampel yang dapat dianalisa dengan metode ini hanya sample yang memiliki warna. Hal ini menjadi kelemahan tersendiri dari metode spektrofotometri visible. Oleh karena itu, untuk sample yang tidak memiliki warna harus terlebih dulu dibuat berwarna dengan menggunakan reagent spesifik yang akan menghasilkan senyawa berwarna. Reagent yang digunakan harus betul-betul spesifik hanya bereaksi dengan analat yang akan dianalisa. Selain itu juga produk senyawa berwarna yang dihasilkan harus benar-benar stabil. Salah satu contohnya adalah pada analisa kadar protein terlarut (soluble protein). Protein terlarut dalam larutan tidak memiliki warna. Oleh karena itu, larutan ini harus dibuat berwarna agar dapat dianalisa. Reagen yang

biasa digunakan adalah reagen Folin. Saat protein terlarut direaksikan dengan Folin dalam suasana sedikit basa, ikatan peptide pada protein akan membentuk senyawa kompleks yang berwarna biru yang dapat dideteksi pada panjang gelombang sekitar 578 nm. Semakin tinggi intensitas warna biru menandakan banyaknya senyawa kompleks yang terbentuk yang berarti semakin besar konsentrasi protein terlarut dalam sample.

2) Spektrofotometer Ultraviolet (UV)

Berbeda dengan spektrofotometer visible, pada spektrofotometer UV berdasarkan interaksi sample dengan sinar UV. Sinar UV memiliki panjang gelombang 190-380nm. Sebagai sumber sinar dapat digunakan lampu deuterium. Deuterium disebut juga heavy hidrogen. Dia merupakan isotop hidrogen yang stabil yang terdapat berlimpah di laut dan daratan. Inti atom deuterium mempunyai satu proton dan satu neutron, sementara hidrogen hanya memiliki satu proton dan tidak memiliki neutron. Nama deuterium diambil dari bahasa Yunani, deuterios, yang berarti 'dua', mengacu pada intinya yang memiliki dua partikel. Karena sinar UV tidak dapat dideteksi oleh mata kita, maka senyawa yang dapat menyerap sinar ini terkadang merupakan senyawa yang tidak memiliki warna. Bening dan transparan. Oleh karena itu, sample tidak berwarna tidak perlu dibuat berwarna dengan penambahan reagent tertentu. Bahkan sample dapat langsung dianalisa meskipun tanpa preparasi. Namun perlu diingat, sampel keruh tetap harus dibuat jernih dengan filtrasi atau centrifugasi. Prinsip dasar pada spektrofotometri adalah sample harus jernih dan larut sempurna. Tidak ada partikel koloid apalagi suspensi.

Sebagai contoh pada analisa protein terlarut (soluble protein). Jika menggunakan spektrofotometri visible, sample terlebih dulu dibuat berwarna dengan reagent Folin, maka bila menggunakan spektrofotometri UV, sample dapat langsung dianalisa. Ikatan peptide pada protein terlarut akan menyerap sinar UV pada panjang gelombang sekitar 280 nm. Sehingga semakin banyak sinar yang diserap sample (Absorbansi tinggi), maka konsentrasi protein terlarut semakin besar. Spektrofotometri UV memang lebih simple dan mudah dibanding spektrofotometri visible, terutama pada bagian preparasi sample. Namun harus hati-hati juga, karena banyak kemungkinan terjadi interferensi dari senyawa lain selain analat yang juga menyerap pada panjang gelombang UV. Hal ini berpotensi menimbulkan bias pada hasil analisa.

3) Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri ini merupakan gabungan antara spektrofotometri UV dan Visible. Menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Meskipun untuk alat yang lebih canggih sudah menggunakan hanya satu sumber sinar sebagai sumber UV dan Vis, yaitu photodiode yang dilengkapi dengan monokromator. Untuk sistem spektrofotometri, UV-Vis paling banyak tersedia dan paling populer digunakan. Kemudahan metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sample berwarna juga untuk sample tak berwarna.

4) Spektrofotometri Infra Red (IR)

Dari namanya sudah bisa dimengerti bahwa spektrofotometri ini berdasar pada penyerapan panjang gelombang infra merah. Cahaya infra merah terbagi menjadi infra merah dekat, pertengahan, dan jauh. Infra

merah pada spektrofotometri adalah infra merah jauh dan pertengahan yang mempunyai panjang gelombang 2.5-1000 μ m. Pada spektro IR meskipun bisa digunakan untuk analisa kuantitatif, namun biasanya lebih kepada analisa kualitatif. Umumnya spektro IR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa, terutama senyawa organik. Setiap serapan pada panjang gelombang tertentu menggambarkan adanya suatu gugus fungsi spesifik. Hasil analisa biasanya berupa signal kromatogram hubungan intensitas IR terhadap panjang gelombang. Untuk identifikasi, signal sample akan dibandingkan dengan signal standard. Perlu juga diketahui bahwa sample untuk metode ini harus dalam bentuk murni. Karena bila tidak, gangguan dari gugus fungsi kontaminan akan mengganggu signal kurva yang diperoleh. Terdapat juga satu jenis spektrofotometri IR lainnya yang berdasar pada penyerapan sinar IR pendek. Spektrofotometri ini di sebut Near Infrared Spectroscopy (NIR). Aplikasi NIR banyak digunakan pada industri pakan dan pangan guna analisa bahan baku yang bersifat rutin dan cepat.

Dari 4 jenis spektrofotometri ini (UV, Vis, UV-Vis dan Ir) memiliki prinsip kerja yang sama yaitu “adanya interaksi antara materi dengan cahaya yang memiliki panjang gelombang tertentu”. Perbedaannya terletak pada panjang gelombang yang digunakan.

2.3.2.3. Fungsi Masing-masing Alat atau Bagian Spektrofotometer

- 1) Sumber sinar polikromatis berfungsi sebagai sumber sinar polikromatis dengan berbagai macam rentang panjang gelombang. Untuk spektrofotometer:

- a. UV menggunakan lampu deuterium atau disebut juga heavy hidrogen
 - b. VIS menggunakan lampu tungsten yang sering disebut lampu wolfram
 - c. UV-VIS menggunakan photodiode yang telah dilengkapi monokromator.
 - d. Infra merah, lampu pada panjang gelombang IR.
- 2) Monokromator berfungsi sebagai penyeleksi panjang gelombang yaitu mengubah cahaya yang berasal dari sumber sinar polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Jenis monokromator yang saat ini banyak digunakan adalah grating atau lensa prisma dan filter optik. Jika digunakan grating maka cahaya akan dirubah menjadi spektrum cahaya. Sedangkan filter optik berupa lensa berwarna sehingga cahaya yang diteruskan sesuai dengan warna lensa yang dikenai cahaya. Ada banyak lensa warna dalam satu alat yang digunakan sesuai dengan jenis pemeriksaan.
- 3) Sel sampel berfungsi sebagai tempat meletakkan sampel.
- a. UV, VIS dan UV-VIS menggunakan kuvet sebagai tempat sampel. Kuvet biasanya terbuat dari kuarsa atau gelas, namun kuvet dari kuarsa yang terbuat dari silika memiliki kualitas yang lebih baik. Hal ini disebabkan yang terbuat dari kaca dan plastik dapat menyerap UV sehingga penggunaannya hanya pada spektrofotometer sinar tampak (VIS). Cuvet biasanya berbentuk persegi panjang dengan lebar 1 cm.

- b. IR, untuk sampel cair dan padat (dalam bentuk pasta) biasanya dioleskan pada dua lempeng natrium klorida. Untuk sampel dalam bentuk larutan dimasukkan ke dalam sel natrium klorida. Sel ini akan dipecahkan untuk mengambil kembali larutan yang dianalisis, jika sampel yang dimiliki sangat sedikit dan harganya mahal.
- 4) Detektor berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Syarat-syarat sebuah detektor :
- a. Kepekaan yang tinggi
 - b. Perbandingan isyarat atau signal dengan bising tinggi
 - c. Respon konstan pada berbagai panjang gelombang
 - d. Waktu respon cepat dan signal minimum tanpa radiasi
 - e. Signal listrik yang dihasilkan harus sebanding dengan tenaga radiasi

Macam-macam detektor:

- a. Detektor foto (Photo detector)
 - b. Photocell, misalnya CdS
 - c. Phototube
 - d. Hantaran foto
 - e. Dioda foto
 - f. Detektor panas
- 5) Read out merupakan suatu sistem baca yang menangkap besarnya isyarat listrik yang berasal dari detektor.

2.3.2.4. Cara Kerja

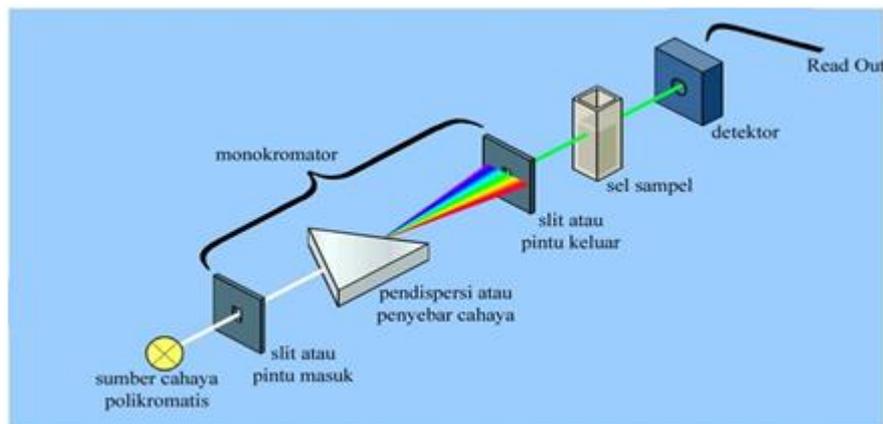
Cara kerja alat spektrofotometer adalah sebagai berikut :

Sumber cahaya polikromatis masuk ke dalam monokromator (disini terjadi penyebaran cahaya)

Dari monokromator kemudian keluar menuju ke sel sampel, pada sel sampel ini terjadi proses penyerapan cahaya oleh zat yang ada dalam sel sampel (dimana cahaya yang masuk lebih terang dibandingkan cahaya setelah keluar)

Selanjutnya cahaya ditangkap oleh detektor dan mengubahnya menjadi arus listrik

Gambar 3. Diagram Alir Cara Kerja Spektrofotometer



Gambar 4. Cara Kerja Spektrofotometer

(Sumber : Anton. 2013)