

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Spektrofotometer

Spektrofotometri merupakan salah satu metode analisis instrumental yang menggunakan dasar interaksi energi dan materi. Spektrofotometri dapat dipakai untuk menentukan konsentrasi suatu larutan melalui intensitas serapan pada panjang gelombang tertentu. Panjang gelombang yang dipakai adalah panjang gelombang maksimum yang memberikan absorbansi maksimum. Salah satu prinsip kerja spektrofotometri didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh space kimia tertentu didaerah ultra violet dan sinar tampak (*visible*).

2.1.1 Spektrofotometri Sinar Tampak (*visible*)

Spektrofotometri visible disebut juga spektrofotometri sinar tampak. Yang dimaksud sinar tampak adalah sinar yang dapat dilihat oleh mata manusia. Cahaya yang dapat dilihat oleh mata manusia adalah cahaya dengan panjang gelombang 400-800 nm dan memiliki energi sebesar 299–149 kJ/mol. Elektron pada keadaan normal atau berada pada kulit atom dengan energi terendah disebut keadaan dasar (ground-state). Energi yang dimiliki sinar tampak mampu membuat elektron tereksitasi dari keadaan dasar menuju kulit atom yang memiliki energi lebih tinggi atau menuju keadaan tereksitasi.

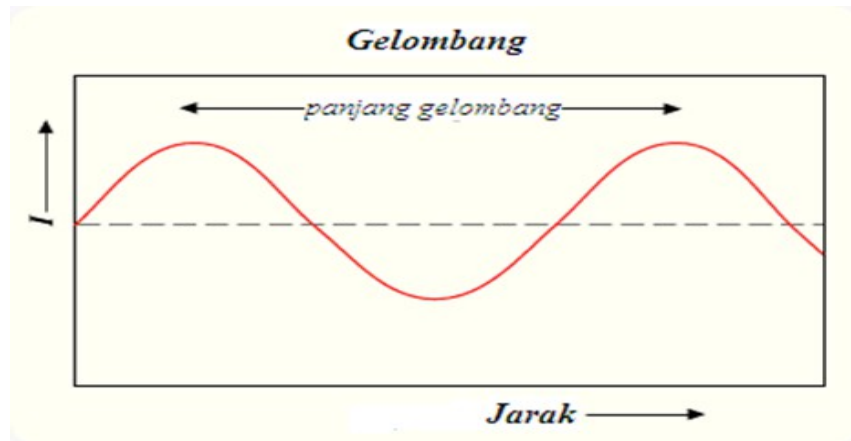
Cahaya atau sinar tampak adalah radiasi elektromagnetik yang terdiri dari gelombang. Seperti semua gelombang, kecepatan cahaya, panjang gelombang dan frekuensi dapat didefinisikan sebagai : $C = V \cdot \lambda$

Dimana :

C = Kecepatan cahaya

V = Frekuensi dalam gelombang per detik (Hertz)

λ = Panjang gelombang dalam meter



Gambar 1. Radiasi Elektromagnetik dengan Panjang Gelombang (λ)

Benda bercahaya seperti matahari atau bohlam listrik memancarkan spektrum lebar yang tersusun dari panjang gelombang. Panjang gelombang yang dikaitkan dengan cahaya tampak itu mampu mempengaruhi selaput pelangi manusia yang mampu menimbulkan kesan subjektif akan ketampakan (*visible*). (A.L.Underwood dan R.A.Day Jr, 2002)

Cahaya/sinar tampak terdiri dari suatu bagian sempit kisaran panjang gelombang dari radiasi elektromagnetik dimana mata manusia sensitif. Radiasi dari panjang gelombang yang berbeda ini dirasakan oleh mata kita sebagai warna berbeda, sedangkan campuran dari semua panjang gelombang tampak seperti sinar putih. Sinar putih memiliki panjang gelombang mencakup 400-700 nm. Panjang gelombang dari berbagai warna adalah sebagai berikut :

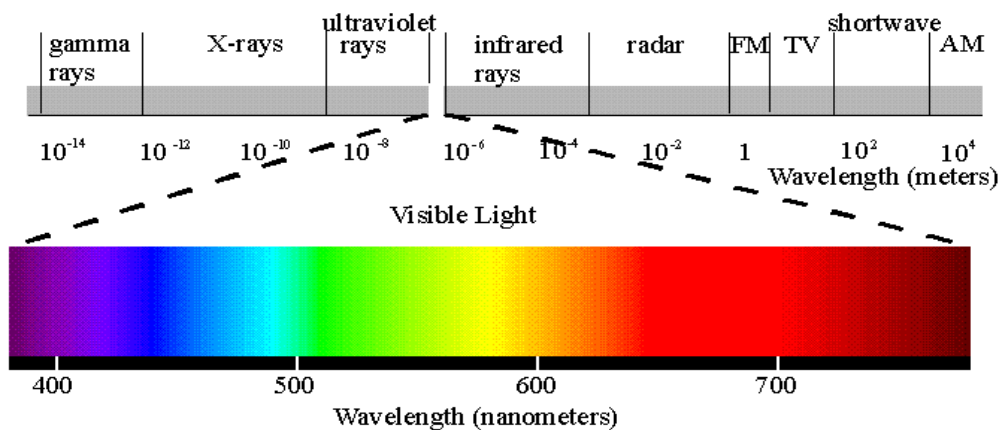
Tabel 1. Panjang Gelombang untuk Setiap Jenis Warna

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)

Spektrofotometri molekular (baik kualitatif dan kuantitatif) bisa dilaksanakan di daerah sinar tampak, sama halnya seperti di daerah sinar ultraviolet dan daerah sinar inframerah.



Gambar 2. Spektrum Gelombang Elektromagnetik Lengkap

Persepsi visual tentang warna dibangkitkan dari penyerapan selektif panjang gelombang tertentu pada peristiwa penyinaran objek berwarna. Sisa panjang gelombang dapat diteruskan (oleh objek transparan) atau dipantulkan (oleh objek yang buram) dan dilihat oleh mata sebagai warna dari pancaran atau pantulan cahaya. Oleh karena itu, objek biru tampak berwarna biru sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari cahaya dari daerah oranye-merah. Sedangkan objek yang merah tampak merah sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari daerah ultraviolet-biru.

Bagaimanapun di dalam spektrofotometri molekul tidak berkaitan dengan warna dari suatu senyawa, yaitu warna yang dipancarkan atau pantulkan, namun berkaitan dengan warna yang telah dipindahkan dari spektrum, seperti panjang gelombang yang telah diserap oleh suatu unsur di dalam suatu larutan. Energi gelombang seperti bunyi dan air ditentukan oleh amplitudo dari getaran (misal tinggi gelombang air) tetapi dalam radiasi elektromagnetik energi ditentukan oleh frekuensi ν , dan *quantized*, terjadi hanya pada tingkatan tertentu :

dimana : h = konstanta Planck, $6,63 \times 10^{-34}$ J.s

Tabel 2. 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 : Suharyo, 2012)

2.1.2 Hukum Lambert Beer

Menurut Hukum Lambert, serapan berbanding lurus terhadap ketebalan sel (b) yang disinari, dengan bertambahnya sel, maka serapan akan bertambah.

$$A = k \cdot b$$

Menurut Beer, yang berlaku untuk radiasi monokromatis dalam larutan yang sangat encer, serapan berbanding lurus dengan konsentrasi.

$$A = k \cdot c$$

Jika konsentrasi bertambah, jumlah molekul yang dilalui berkas sinar akan bertambah, sehingga serapan juga bertambah. Kedua persamaan ini digabungkan dalam Hukum Lambert-Beer, maka diperoleh bahwa serapan berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan sel yang dapat ditulis dengan persamaan :

$$A = k \cdot c \cdot b$$

Umumnya digunakan dua satuan c (konsentrasi zat yang menyerap) yang berlainan, yaitu gram per liter atau mol per liter. Nilai tetapan (k) dalam hukum Lambert-Beer tergantung pada sistem konsentrasi mana yang digunakan. Bila c dalam gram per liter, tetapan disebut dengan absorptivitas (a) dan bila dalam mol per liter, tetapan tersebut adalah absorptivitas molar (ϵ). Jadi dalam sistem dikombinasikan, hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dalam rumus berikut :

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ (g/liter) atau } A = \epsilon \cdot b \cdot c \text{ (mol/liter)}$$

Dimana : A = serapan

c = konsentrasi

a = absorptivitas

ϵ = absorptivitas molar

b = ketebalan sel

Hukum Lambert-Beer menjadi dasar aspek kuantitatif spektrofotometri dimana konsentrasi dapat dihitung berdasarkan rumus di atas. Absorptivitas (a) merupakan konstanta yang tidak tergantung pada konsentrasi, tebal kuvet dan intensitas radiasi yang mengenai larutan

sampel. Absorptivitas tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang radiasi (Day and Underwood, 1999; Rohman, 2007). Menurut Roth dan Blaschke (1981), absorptivitas spesifik juga sering digunakan untuk menggantikan absorptivitas. Harga ini, memberikan serapan larutan 1 % (b/v) dengan ketebalan sel 1 cm, sehingga dapat diperoleh persamaan :

$$A = .b.c$$

Dimana : = absorptivitas spesifik

 b = ketebalan sel

 c = konsentrasi senyawa terlarut (g/100ml larutan)

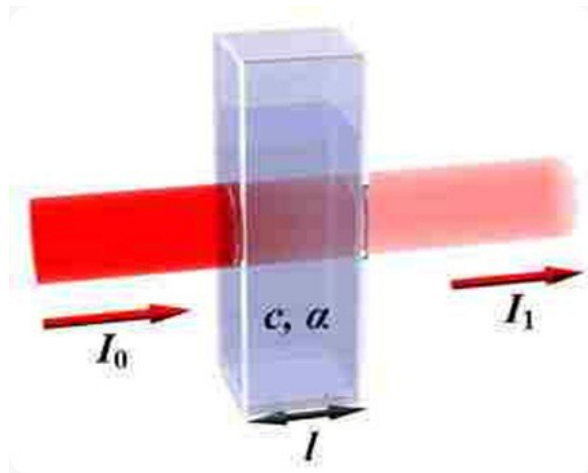
2.1.3 Proses Absorpsi Cahaya pada Spektrofotometri

Ketika cahaya dengan panjang berbagai panjang gelombang (cahaya polikromatis) mengenai suatu zat, maka cahaya dengan panjang gelombang tertentu saja yang akan diserap. Di dalam suatu molekul yang memegang peranan penting adalah elektron valensi dari setiap atom yang ada hingga terbentuk suatu materi. Elektron-elektron yang dimiliki oleh suatu molekul dapat berpindah (eksitasi), berputar (rotasi) dan bergetar (vibrasi) jika dikenai suatu energi.

Jika zat menyerap cahaya tampak dan ultraviolet maka akan terjadi perpindahan elektron dari keadaan dasar menuju ke keadaan tereksitasi. Perpindahan elektron ini disebut transisi elektronik. Apabila cahaya yang diserap adalah cahaya inframerah maka elektron yang ada dalam atom atau elektron ikatan pada suatu molekul dapat hanya akan bergetar (vibrasi). Sedangkan gerakan berputar elektron terjadi pada energi yang lebih rendah lagi misalnya pada gelombang radio.

Atas dasar inilah spektrofotometri dirancang untuk mengukur konsentrasi yang ada dalam suatu sampel. Dimana zat yang ada dalam sel sampel disinari dengan cahaya yang memiliki panjang gelombang tertentu. Ketika cahaya mengenai sampel sebagian akan diserap, sebagian akan dihamburkan dan sebagian lagi akan diteruskan.

Pada spektrofotometri, cahaya datang atau cahaya masuk atau cahaya yang mengenai permukaan zat dan cahaya setelah melewati zat tidak dapat diukur, yang dapat diukur adalah I_t/I_0 atau I_0/I_t (perbandingan cahaya datang dengan cahaya setelah melewati materi (sampel)). Proses penyerapan cahaya oleh suatu zat dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 3. Proses Penyerapan Cahaya oleh Suatu Zat

Gambar Proses penyerapan cahaya oleh zat dalam sel sampel. dari gambar terlihat bahwa zat sebelum melewati sel sampel lebih terang atau lebih banyak dibanding cahaya setelah melewati sel sampel. Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang hamburkan diukur sebagai transmitansi (T), dinyatakan dengan hukum lambert-beer atau Hukum Beer, berbunyi:

“Jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan”.

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)

Spektrofotometer modern dikalibrasi secara langsung dalam satuan absorbansi. (Dalam beberapa buku lama $\log I_0/I$ disebut densitas optik dan I digunakan sebagai ganti simbol P). Perbandingan I/I_0 disebut transmitans (T), dan beberapa instrumen disajikan dalam % transmitans, $(I/I_0) \times 100$. Sehingga hubungan absorbansi dan transmitans dapat ditulis sebagai :

Dengan menggunakan beberapa instrumen, hasil pengukuran tercatat sebagai 56 transmitansi dan absorbansi dihitung dengan menggunakan rumus tersebut. Dari pembahasan di atas dapat dikatakan bahwa konsentrasi dari suatu unsur berwarna harus sebanding dengan intensitas warna larutan. Ini adalah dasar pengukuran yang menggunakan pembandingan visual di mana intensitas warna dari suatu larutan dari suatu unsur yang konsentrasinya tidak diketahui dibandingkan dengan intensitas warna dari sejumlah larutan yang diketahui konsentrasinya.

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.

2.1.4 Peralatan untuk Spektrofotometri

Dalam analisis spektrofotometri digunakan suatu sumber radiasi yang masuk ke dalam daerah spektrum ultraviolet itu. Dari spektrum ini, dipilih panjang-panjang gelombang tertentu dengan lebar pita kurang dari 1 nm. Proses ini menggunakan instrumen yang disebut spektrofotometer. Alat ini terdiri dari spektrometer yang menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer sebagai alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi (Bassett, 1994; Khopkar, 1990).

Unsur-unsur terpenting suatu spektrofotometer adalah sebagai berikut:

1. Sumber-sumber lampu

Lampu deuterium digunakan untuk daerah UV pada panjang gelombang dari 190-350 nm, sementara lampu halogen kuarsa atau lampu tungsten digunakan untuk daerah visibel pada panjang gelombang antara 350-900 nm.

2. Monokromotor

Monokromator digunakan untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis. Alatnya dapat berupa prisma maupun grating. Untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diinginkan dari hasil penguraian.

3. Kuvet (sel)

Kuvet digunakan sebagai wadah sampel untuk menaruh cairan ke dalam berkas cahaya spektrofotometer. Kuvet itu haruslah meneruskan energi radiasi dalam daerah spektrum yang diinginkan. Pada pengukuran di daerah tampak, kuvet kaca atau kuvet kaca corex dapat digunakan, tetapi untuk pengukuran pada daerah ultraviolet harus menggunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Kuvet tampak dan ultraviolet yang khas mempunyai ketebalan 1 cm, namun tersedia kuvet dengan ketebalan yang sangat beraneka, mulai dari ketebalan kurang dari 1 mm sampai 10 cm bahkan lebih.

4. Detektor

Detektor berperan untuk memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang.

5. Suatu amplifier (penguat) dan rangkaian yang berkaitan yang membuat isyarat listrik itu dapat dibaca.

6. Sistem pembacaan yang memperlihatkan besarnya isyarat listrik.

(Day and Underwood, 1981)

2.2 Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Daun singkong merupakan daun dari tanaman singkong (*Manihot utilissima*) yang berbentuk menjari dan berwarna hijau. Daun singkong umumnya berbelah agak dalam seperti jari tangan, jumlah belahan sirip daun pada satu tangkai berkisar antara 5 sampai 9 buah. Permukaan daun sebelah atas berwarna hijau dengan panjang antara 5-30 cm. Warna tangkai daun bervariasi dari hijau muda ke hijau kekuning-kuningan

(Sosrosoedirdjo, 1978).

Gambar daun singkong dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Bentuk Daun Singkong
(Sumber : Anonim, 2012)

Daun singkong dalam taksonomi tumbuhan diklasifikasikan sebagai kingdom Plantae, divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, sub-kelas Rosidae, ordo Euphorbiales, famili Euphorbiaceae, genus Manihot, spesies *Manihot utilissima* Burn F (Tjitrosoepomo, 2005). Daun yang dihasilkan dapat mencapai 20 ton/Ha pada singkong yang ditanam khusus dan diambil daunnya (Rubatzky, 1998).

Kandungan gizi daun singkong dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 3. Kandungan Energi dan Zat Gizi Daun Singkong dalam 100 g Bdd

Kandungan	Jumlah
-----------	--------

Energi (kkal)	50,00
Air (g)	84,40
Protein (g)	6,20
Lemak (g)	1,10
Karbohidrat (g)	7,10
Serat (g)	2,40
Abu (g)	1,20
Kalsium (mg)	166,00
Fosfor (mg)	99,00
Besi (mg)	1,30
Karoten total (μ g)	7.052,00
Tiamin (mg)	0,04
Riboflavin (mg)	0,10
Niasin (mg)	1,80
Vitamin C (mg)	103,00

(Sumber : Persagi, 2009)

Daun biasanya dipanen dari kultivar tipe manis yang mengandung glukosida rendah. Daun yang masih muda biasanya dimakan sebagai lalapan baik mentah maupun direbus terlebih dahulu. Daun yang sudah tua dimanfaatkan untuk makanan ternak. Manfaat daun singkong untuk terapi antara lain mencegah anemia, mencegah konstipasi, dan meningkatkan daya tahan tubuh. Daun singkong adalah sumber vitamin C yang baik serta mengandung sekitar 30% protein berdasarkan bobot kering.

Selain mineral dan vitamin, daun singkong juga mengandung pigmen yang menyebabkan kenampakan sayur berwarna-warni yang menarik. Salah satu pigmen yang ada dalam sayuran adalah pigmen karoten. Pigmen ini memberikan warna kuning hingga oranye pada bahan. Contoh bahan yang banyak mengandung pigmen jenis ini adalah daun singkong, wortel, ubi, labu besar kuning, dan jagung. Pigmen karoten terdiri atas beberapa macam, salah satunya adalah β -karoten. β -karoten ini berfungsi sebagai antioksidan, penting dalam pembentukan vitamin A, untuk pertumbuhan sel-sel epitel tubuh, mengatur rangsang sinar pada saraf

mata, dan membantu pembentukan pigmen di retina mata. Kandungan β -karoten dalam bahan hasil pertanian juga berbeda-beda dan untuk menentukan kadar β -karoten dalam bahan dapat dilakukan dengan teknik spektrofotometri.

2.3 β -karoten

β -karoten adalah pigmen berwarna dominan merah-jingga yang ditemukan secara alami pada sayur dan buah-buahan seperti wortel, ubi, jagung, dan sayuran berwarna kuning yang tertutup warna hijau klorofil. β -karoten merupakan senyawa organik, secara kimiawi diklasifikasikan sebagai hidrokarbon, dan secara spesifik diklasifikasikan sebagai terpenoid (isoprenoid), mencerminkan bahwa ia merupakan turunan unit isoprene. β -karoten disintesis oleh tumbuhan geraniil-geraniil pirofosfat.

β -karoten adalah salah satu jenis senyawa hidrokarbon karotenoid yang merupakan senyawa golongan tetraterpenoid (Winarsi, 2007). Adanya ikatan ganda menyebabkan β -karoten peka terhadap oksidasi. Oksidasi β -karoten akan lebih cepat dengan adanya sinar, dan katalis logam, khususnya tembaga, besi dan mangan. Oksidasi akan terjadi secara acak pada rantai karbon yang mengandung ikatan rangkap. β -karoten merupakan penangkap oksigen dan sebagai antioksidan yang potensial, tetapi β -karoten efektif sebagai pengikat radikal bebas bila hanya tersedia oksigen 2–20 %. Pada tekanan oksigen tinggi diatas kisaran fisiologis, karoten dapat bersifat pro-oksidan (Burton, 1989).

Karoten merupakan salah satu senyawa pigmen dari tumbuhan ataupun hewan yang memiliki struktur polyene yaitu senyawa organik dengan atom karbon berantai lurus memiliki ikatan rangkap. Pada hewan,

karotenoid terikat pada lipid sebagai lipochrome. Sedangkan pada tumbuhan karotenoid terdapat sebagai pigmen berwarna kuning atau oranye. β -karoten merupakan senyawa yang bersifat larut dalam lemak, tidak larut dalam air, mudah rusak karena teroksidasi pada suhu tinggi, dan menjadi penyusun vitamin A.

β -karoten berfungsi sebagai antioksidan, penting dalam pembentukan vitamin A, untuk pertumbuhan sel-sel epitel tubuh, mengatur rangsang sinar pada saraf mata, dan membantu pembentukan pigmen di retina mata.

Pigmen karotenoid dapat mengalami proses kerusakan atau degradasi karena beberapa faktor, yaitu ikatan rangkap karotenoid mudah teroksidasi oleh oksigen sehingga akan dihasilkan epoksi (keton); degradasi pada jembatan ikatan isoprene ditengah, bukan pada ring ionone; adanya pemanasan akan dapat merusak mol karotenoid sehingga warna dan potensi vitamin A berubah. Ada 3 macam karotenoid, yaitu :

- karoten yang tidak memiliki gugus metil pada ujung molekulnya
- karoten dan β -karoten yang memiliki 2 atom ring ionone penuh
- karoten yang salah satu ring iononnya terbuka lycopene (tidak memiliki ring ionone)