

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Spektrofotometri

2.1.1. Pengertian Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah ilmu yang mempelajari tentang metode-metode untuk menghasilkan dan menganalisis spektrum. Interpretasi spektrum yang dihasilkan dapat digunakan untuk analisis unsur kimia, meneliti arus energi atom dan molekul, meneliti struktur molekul, dan untuk menentukan komposisi dan gerak benda-benda langit (Danusantoso, 1995: 409).

Dikenal dua kelompok utama spektroskopi, yaitu spektroskopi atom dan spektroskopi molekul. Dasar dari spektroskopi atom adalah tingkat energi elektron terluar suatu atom atau unsur, sedang dasar dari spektroskopi molekul adalah tingkat energi molekul yang melibatkan energi elektronik, vibrasi, dan rotasi. Berdasarkan sinyal radiasi elektromagnetik, spektroskopi dibagi menjadi empat golongan yaitu spektroskopi absorpsi, spektroskopi emisi, spektroskopi *scattering*, dan spektroskopi fluoresensi. Pada spektroskopi absorpsi, terdapat beberapa tipe metode spektroskopi berdasarkan sifat radiasinya, yaitu spektroskopi absorpsi atom (nyala), absorpsi atom (tanpa nyala) dan absorpsi sinar-x. Pada spektroskopi emisi, terdapat beberapa tipe metode spektroskopi yaitu arc spark, plasma argon, emisi atom atau emisi nyala dan emisi sinar-x. Alat untuk mengukur panjang gelombang cahaya secara akurat dengan menggunakan kisi difraksi atau prisma untuk memisahkan panjang gelombang yang berbeda disebut spektrometer.

Jenis spektrofotometer antara lain adalah spektrofotometer sinar tampak, spektrofotometer ultra-ungu, spektrofotometer infra-merah, spektrofotometer resonansi magnet inti, spektrofotometer serapan, spektrofotometer massa, dan spektrofotometer fluoresensi. Perbedaan dari jenis spektrofotometer tersebut terletak pada sumber cahaya atau sampel yang disesuaikan dengan apa yang akan diteliti. Pada spektrofotometer sinar tampak, contohnya pada serapan cahaya dari radiasi panas plasma, sumber cahaya plasma difokuskan oleh lensa pemfokus dan diterima monokromator, kemudian dipilih panjang gelombang yang sesuai dengan mengatur selektor panjang gelombang, dan pada saat yang tepat ada cahaya keluaran yang ditangkap fotodiode kemudian sinyal dari fotodiode diteruskan ke osiloskop. Fotodiode yang digunakan sekiranya yang cocok dengan panjang gelombang cahaya dari sumber cahaya plasma tersebut (Widdi Usada, 2009: 1).

Komponen-komponen pokok spektrofotometer terdiri dari empat bagian penting yaitu sumber radiasi/cahaya, monokromator, tempat cuplikan (kuvet), dan detektor. Sumber radiasi adalah suatu sumber energi yang memancarkan pancaran radiasi elektromagnetik, sedangkan monokromator adalah alat yang paling umum dipakai untuk menghasilkan berkas radiasi dengan satu panjang gelombang. Monokromator untuk radiasi ultra violet, sinar tampak dan infra merah adalah serupa, yaitu mempunyai celah (*slit*), lensa, cermin, dan prisma atau *grating*. Terdapat dua macam monokromator yaitu monokromator prisma bunsen dan monokromator *grating* Czerny-Turney.

2.1.2. 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 spectrum lebar yang tersusun dari panjang gelombang. Panjang gelombang yang dikaitkan dengan cahaya tampak itu mampu mempengaruhi selaput pelangi

manusia yang mampu menimbulkan kesan subyektif akan ketampakan (*visible*). (A.L.Underwood dan R.A.Day Jr,1986).

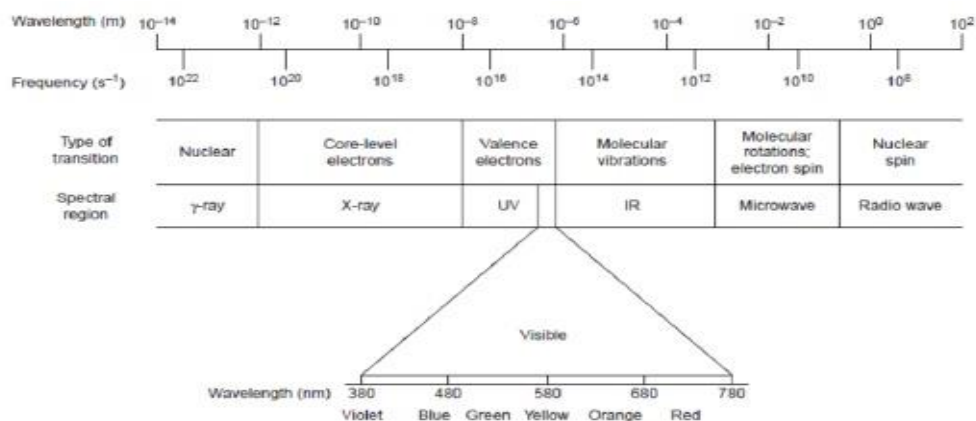
Cahaya /sinar tampak terdiri dari suatu bagian sempit kisaran panjang gelombang dari radiasi elektromagnetik dimana mata manusia sensitive. Radiasi dari panjang gelombang yang berbeda ini dirasakan oleh mata kita sebagai warna berbeda, sedangkan campuran dari semua panjang gelombang tampak seperti sinar putih. 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 : Underwood, 2002)

Spektrometri molekular (baik kualitatif dan kuantitatif) bisa dilaksanakan di daerah sinar tampak.



Gambar 2. Spektrum gelombang elektromagnetik lengkap

(Sumber : Harvey,2000)

Persepsi visual tentang warna dibangkitkan dari penyerapan selektif panjang gelombang tertentu pada peristiwa penyinaran obyek berwarna.Sisa

panjang gelombang dapat diteruskan (oleh obyek transparan) atau dipantulkan (oleh obyek yang buram) dan dilihat oleh mata sebagai warna dari pancaran atau pantulan cahaya. Oleh karena itu obyek biru tampak berwarna biru sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari cahaya dari daerah oranye-merah. Sedangkan obyek yang merah tampak merah sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari daerah ultraviolet-biru.

Bagaimanapun, di dalam spektrometri 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 :

$$E = h \cdot \nu$$

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

Tabel 2. Panjang gelombang berbagai warna cahaya

λ (nm)	Warna yang teradsorbsi	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 : Underwood, 2002)

2.1.3. Proses Absorbsi Cahaya pada Spektrofotometri

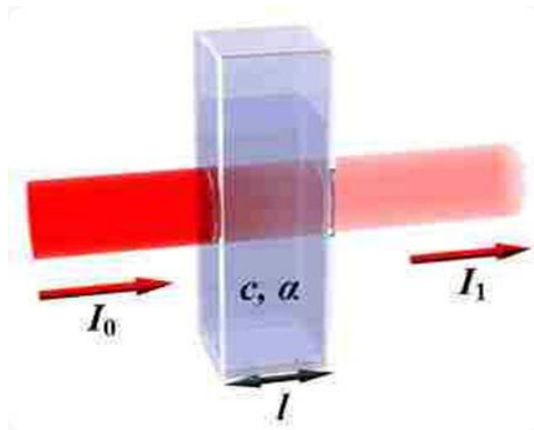
Ketika cahaya dengan panjang berbagai panjang gelombang (cahaya polikromatis) mengenai suatu zat, maka cahaya dengan panjang gelombang

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 Proses penyerapan cahaya oleh zat dalam sel sampel. dari gambar terlihat bahwa zat sebelum melewati sel sampel lebih terang atau lebih banyak di banding 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:

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

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.

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:

$$A = -\log T$$

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. (Kusnanto Mukti, 2000)

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.

(Anonim, 2015)

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. 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): 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: berperan untuk memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang.

5. Suatu amplifiser (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. Ekstraksi

2.2.1. Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu metoda operasi yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah massa bahan (solven) sebagai tenaga pemisah. Apabila komponen yang akan dipisahkan (solute) berada dalam fase padat, maka proses tersebut dinamakan pelindihan atau leaching.

Proses pemisahan dengan cara ekstraksi terdiri dari tiga langkah dasar.

1. Proses penyampuran sejumlah massa bahan ke dalam larutan yang akan dipisahkan komponen – komponennya.
2. Proses pembantuan fase seimbang.
3. Proses pemisahan kedua fase seimbang.

Sebagai tenaga pemisah, solven harus dipilih sedemikian hingga kelarutannya terhadap salah satu komponen murninya adalah terbatas atau sama sekali tidak saling melarutkan. Karenanya, dalam proses ekstraksi akan terbentuk

dua fase cairan yang saling bersinggungan dan selalu mengadakan kontak. Fase yang banyak mengandung diluen disebut fase rafinat sedangkan fase yang banyak mengandung solven dinamakan ekstrak.

Terbentuknya dua fase cairan, memungkinkan semua komponen yang ada dalam campuran terbesar dalam masing – masing fase sesuai dengan koefisien distribusinya, sehingga dicapai keseimbangan fisis.

Pemisahan kedua fase seimbang dengan mudah dapat dilakukan jika density fase rafinat dan fase ekstrak mempunyai perbedaan yang cukup. Tetapi jika density keduanya hampir sama proses pemisahan semakin sulit, sebab campuran tersebut cenderung untuk membentuk emulsi.

Komponen – komponen yang terdapat dalam larutan, menentukan jenis/macam solven yang digunakan dalam ekstraksi. Pada umumnya, proses ekstraksi tidak berdiri sendiri, tetapi melibatkan operasi – operasi lain seperti proses pemungutan kembali solven dari larutannya (terutama fase ekstrak), hingga dapat dimanfaatkan kembali sebagai tenaga pemisah. Untuk maksud tersebut, banyak cara yang dapat dilakukan misalnya dengan metode distilasi, pemanasan sederhana atau dengan cara pendinginan untuk mengurangi sifat kelarutannya.

2.2.2. Ekstraksi Cair-Cair

Proses pemisahan secara ekstraksi dilakukan jika campuran yang akan dipisahkan berupa larutan homogen (cair – cair) dimana titik didih komponen yang satu dengan komponen yang lain yang terdapat dalam campuran hampir sama atau berdekatan.

Pada proses pemisahan secara ekstraksi , face cairan II segera terbentuk setelah sejumlah massa solven ditambahkan kedalam campuran (ciaran I) yang akan dipisahkan. Sebeelum campuran dua fase dipisahkan meenjadi produk

ekstrak dan produk rafinat, suatu usaha harus dilakukan dengan mempertahankan kontak antara fase cairan I dengan fase cairan II sedemikian hingga pada suhu dan tekanan tertentu campuran dua fase berada dalam kesetimbangan.

Jika antara solven dan diluen tidak saling melarutkan, maka sistem tersebut dikenal sebagai Ekstraksi Insoluble Liquid. Tetapi antar solven dan diluen sedikit saling melarutkan disebut Ekstraksi Soluble Liquid. Sebagai tenaga pemisah, solven harus memenuhi kriteria berikut :

1. Daya larut terhadap solute cukup besar.
2. Sama sekali tidak melarutkan diluen atau hanya sedikit melarutkan diluen.
3. Antara solvent dengan diluen harus mempunyai perbedaan density yang cukup.
4. Antara solven dengan solute harus mempunyai perbedaan titik didih atau tekanan uap murni yang cukup.
5. Tidak beracun.
6. Tidak bereaksi baik terhadap solute maupun diluen.
7. Murah, mudah didapat.

2.3. Daun Pepaya (*Carica papaya L.*)

Daun pepaya merupakan salah satu jenis sayuran yang diolah pada saat masih muda menjadi makanan yang lezat dan bergizi tinggi. Disamping dapat diolah menjadi makanan yang lezat, daun pepaya dapat pula dijadikan obat untuk beberapa jenis penyakit. Helaiian daun pepaya berbentuk menyerupai tangan manusia. Apabila daun pepaya dilipat tepat di tengah, maka akan nampak bahwa daun pepaya berbentuk simetris.

Daun pepaya memiliki kandungan gizi yang cukup beragam diantaranya vitamin A 18250 SI, vitamin B1 0,15 miligram per 100 gram, vitamin C 140 miligram per 100 gram daun pepaya, kalori 79 kal per 100 gram, protein 8,0 gram per 100 gram, lemak 2,0 gram per 100 gram, hidrat arang/karbohidrat 11,9 gram per 100 gram, kalsium 353 miligram per 100 gram, dan air 75,4 gram per 100 gram. Daun pepaya juga mengandung carposide yang dapat berfungsi sebagai obat cacing. Daun pepaya mengandung zat papain yang tinggi sehingga menjadikan rasanya pahit, namun zat ini justru bersifat stomakik yaitu dapat meningkatkan nafsu makan.

Adapun menurut taksonomi, Dalam sistematika tumbuhan, tanaman pepaya diklasifikasikan ke dalam :

- Kingdom : *Plantae (Tumbuhan)*
- Subkingdom : *Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)*
- Super Divisi : *Spermatophyta (Menghasilkan biji)*
- Divisi : *Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)*
- Kelas : *Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)*
- Sub Kelas : *Dilleniidae*
- Ordo : *Violales*
- Famili : *Caricaceae*
- Genus : *Carica*
- Spesies : *Carica papaya L.*

Tabel 3. Kandungan gizi tanaman pepaya per 100 gram

Zat Gizi	Buah pepaya masak	Buah pepaya muda	Daun pepaya
Energi (kkal)	46	26	79
Protein (g)	0,5	2,1	8,0
Lemak (g)	0	0,1	2,0
Karbohidrat (g)	12,2	4,9	11,9
Kalsium (mg)	23	50	353
Fosfor (mg)	12	16	63
Besi (mg)	1,7	0,4	0,8
Vitamin A (SI)	365	50	18.250
Vitamin B1 (mg)	0,04	0,02	0,15
Vitamin C (mg)	78	19	140
Air (g)	86,7	92,3	75,4

(Sumber : Anonim 2010)

2.4. Klorofil

2.4.1. Pengertian Klorofil

Klorofil adalah pigmen warna hijau yang berperan dalam proses fotosintesis dengan menyerap dan mengubah energi cahaya menjadi energi kimia. Klorofil terdapat pada tumbuhan, alga dan bakteri fotosintetik. Istilah “Klorofil” berasal dari bahasa Yunani yaitu “chloros” artinya hijau dan “phyllos” artinya daun. Istilah ini pertama diperkenalkan tahun 1818. dimana pigmen tersebut diekstrak dari tumbuhan dengan menggunakan pelarut organik. Riset tersebut dilakukan oleh Hans Fischer peneliti klorofil yang memperoleh nobel prize winner pada tahun 1915 berasal dari Technische Hochschule, Munich Germany.

Pada proses fotosintesis, terdapat 3 fungsi utama dari klorofil yaitu :

1. Memanfaatkan energi matahari.

2. Memicu fiksasi CO₂ menjadi karbohidrat dan menyediakan dasar energetik bagi ekosistem secara keseluruhan.

3. Karbohidrat yang dihasilkan fotosintesis melalui proses anabolisme diubah menjadi protein, lemak, asam nukleat dan molekul organik lainnya.

Klorofil menyerap cahaya berupa radiasi elektromagnetik pada spektrum kasat mata (visible). Misalnya, cahaya matahari mengandung semua warna spektrum kasat mata dari merah sampai violet, tetapi seluruh panjang gelombang unsurnya tidak diserap dengan baik secara merata oleh klorofil. Cahaya matahari (cahaya tampak) jika diuraikan sebenarnya terdiri dari berbagai cahaya dengan panjang gelombang berbeda yang dengan bantuan prisma kita bisa mendeteksinya sebagai cahaya merah, jingga, kuning, hijau, biru, nila dan ungu (seperti pelangi). Klorofil menyerap cahaya merah dan biru-ungu yang berguna dalam reaksi terang fotosintesis, sedangkan cahaya kuning, hijau dipantulkan. Itulah kenapa daun tampak berwarna hijau. Klorofil dapat menampung energi cahaya yang diserap oleh pigmen cahaya atau pigmen lainnya melalui fotosintesis, sehingga klorofil disebut sebagai pigmen pusat reaksi fotosintesis. Dalam proses fotosintesis tumbuhan hanya dapat memanfaatkan sinar dengan panjang gelombang antara 400-700 nm.

2.4.2 Macam-macam klorofil

Pada tumbuhan didapatkan bermacam-macam pigmen yang berperan menyerap energi cahaya. Pigmen fotosintetis terdapat dalam kloroplas yang terdiri dari klorofil a, b, santofil, karotenoid, bakterioklorofil pada bakteri. Pigmen ini menyerap warna atau gelombang cahaya yang berbeda-beda. Masing-masing menyerap maksimum pada gelombang cahaya tertentu. Pigmen umumnya mempunyai

penyerapan maksimum pada gelombang cahaya pendek dan juga panjang. Untuk memaksimalkan penyerapan energi cahaya, maka pada kloroplas terdapat kelompok pemanen cahaya yang disebut dengan antena yang terdiri dari bermacam-macam pigmen, pigmen yang paling banyak pada kloroplas adalah klorofil. Klorofil merupakan pigmen yang berwarna hijau yang terdapat pada kloroplast. Pigmen ini berguna untuk melangsungkan fotosintesis pada tumbuhan. Aneka bentuk dan ukuran kloroplast ditemukan pada berbagai tumbuhan (Salisbury and Ross, 1995). Pada tanaman tingkat tinggi ada 2 macam klorofil yaitu yang berwarna hijau tua dan berwarna hijau muda. Klorofil-a dan b paling kuat menyerap cahaya di bagian merah (600-700 nm), sedangkan yang paling sedikit cahaya hijau (500-600 nm). Sedangkan cahaya berwarna biru dari spektrum tersebut diserap oleh karotenoid. Karotenoid ternyata berperan membantu mengabsorpsi cahaya sehingga spektrum matahari dapat dimanfaatkan dengan lebih baik. Energi yang diserap karotenoid diteruskan kepada klorofil-a untuk diserap digunakan dalam proses fotosintesis, demikian pula dengan klorofil-b. Perbedaan klorofil a dan b adalah pada atom C3 terdapat gugusan metil untuk klorofil a dan aldehid untuk klorofil b. karena itu keduanya mempunyai penyerapan gelombang cahaya yang berbeda. Peranan pigmen klorofil adalah dalam reaksi fotosistem. Klorofil mempunyai banyak electron yang mampu berpindah ke orbit eksitasi karena menyerap cahaya (Nurdin, 1997).

Fotosintesis terjadi pada semua bagian berwarna hijau pada tumbuhan karena memiliki kloroplas, tetapi tempat utama berlangsungnya fotosintesis adalah daun. Pigmen warna hijau yang terdapat pada kloroplas disebut dengan klorofil dan dari zat inilah warna daun berasal. Klorofil menyerap energy cahaya yang

menggerakkan sintesis molekul makanan dalam kloroplas untuk menghasilkan energi (Campbell, 2002).

Kadar dari klorofil yang terkandung dalam suatu organ tumbuhan dapat diukur dengan metoda spektrofotometer. Sel penutup pada lembaran daun yang mengandung klorofil, didalam stroma pada sel tersebut akan berlangsung fotosintesis yang akan menghasilkan karbohidrat (gula). Gula tersebut menyebabkan potensial osmotik cairan sel yang menurun, potensial air juga akan menurun, dengan peristiwa itu timbul tekanan turgor yang dapat menyebabkan terbentuknya stroma (Kimball, 1988).

2.4.3. Letak Klorofil

Klorofil sangat penting bagi tumbuhan untuk melaksanakan fotosintesis dan menghasilkan energi. Klorofil merupakan pigmen kloroplast yang terdapat dalam plastid. Plastid merupakan struktur khusus, diselimuti oleh system membran rangkap ditemui hanya pada tumbuhan dan beberapa protista. Plastid mengandung DNA dan ribosom yang terbenam (bersama membrane) dalam cair yang disebut stroma (Salisbury dan Ross, 1995).

Sel penutup memiliki klorofil dalam selnya sehingga dengan bantuan cahaya matahari dapat melakukan fotosintesis. Terlalu banyak sinar berpengaruh buruk terhadap klorofil. Larutan klorofil yang dihadapkan pada sinar kuat akan berkurang hijaunya dan daun yang kena sinar matahari langsung pada umumnya berwarna hijau kekuningan.

Spectrum absorpsi klorofil a dan klorofil b berbeda. Cahaya yang tidak cukup absorpsi oleh klorofil a panjang gelombang 460 nm akan ditangkap oleh klorofil b yang mempunyai absorpsi yang kuat pada panjang gelombang tersebut. Jadi kedua jenis klorofil ini saling melengkapi dalam mengabsorbsikan cahaya

matahari. Daerah spectrum antara 500 nm dan 600 nm sangat lemah absorpsi oleh klorofil, tetapi hal demikian tidak menjadi masalah bagi kebanyakan tanaman hijau (Striyer, 1996).

Pada daun muda terjadi fotosintesis yang aktif sehingga membutuhkan klorofil yang banyak. Klorofil tersebut akan menyerap cahaya yang berenergi tinggi sehingga fotosintesis terjadi lebih aktif. Daun muda juga mendapatkan transfer klorofil melalui eksitasi dari daun tua (Dwijoseputro, 1980).

2.4.4. Menentukan kadar klorofil daun

Salah satu cara untuk menentukan kadar klorofil daun dengan metoda atau alat spektrofotometer. Spektrofotometer termasuk dalam analisa kuantitatif yang didasarkan pada sifat warna larutan yang terjadi, atau merupakan salah satu pembagian kalorimetri. Disini dipakai alat spektrofotometer. Metoda ini dapat digunakan apabila ; sample yang di ukur harus berwarna, kestabilan warna cukup lama, intensitas warna terjadi cukup tajam, warna larutan harus bebas dari gangguan. Warna larutan yang terjadi berbanding lurus dengan kosentrasi larutan (Khopkar, 1990).

Cahaya yang dipantulkan atau dipancarkan oleh daun tidak efektif bagi fotosintesis, sebab untuk menghasilkan perubahan kimia cahaya itu harus diabsorpsi terlebih dahulu. Diketahui bahwa hanya bagian hijau pada tumbuhan yang melaksanakan fotosintesis daun, cukup alasan untuk menduga bahwa hanya bagian pigmen hijau kloroplaslah yang menyerap cahaya yang dipantulkan untuk proses tersebut. Cahaya yang diserap ini dapat ditentukan dengan spektrofotometer (Dwijoseputro, 1980).

Penyerapan relatif untuk setiap panjang gelombang oleh pigmen dapat diukur dengan spektrofotometer. Grafik penyerapan cahaya untuk kisaran panjang gelombang tertentu disebut dengan spektrum serapan (Dermawan, 1983).

Menurut Noggle dan Fritz (1979), klorofil akan memperlihatkan fluoresensi berwarna merah yang berarti warna larutan tersebut tidak hijau pada cahaya yang diluruskan dan akan merah tua pada cahaya yang dipantulkan.

Klorofil dibentuk dari kodensasi suksinil CoA beserta dengan asam amino glisin menjadi suatu senyawa. Setelah melalui beberapa tahap reaksi, selanjutnya dengan adanya fitol dan enzim klorofilase dirubah menjadi klorofil. Pada klorofil a terdapat gugusan metal, sedangkan pada klorofil b terdapat gugusan aldehid (Darmawan, 1983).

Klorofil tidak larut dalam air, melainkan larut dalam etanol, methanol, eter, aseton, bensol dan kloroform. Untuk memisahkan klorofil a dan klorofil b beserta pigmen- pigmen lain karotin, xantofil, organ menggunakan suatu teknik spektrofotometri. Kalau kita perhatikan suatu larutan zat yang berwarna. Makin pekat larutan tadi makin banyak menyerap cahaya sehingga kelihatan makin gelap. Adanya hubungan antara penyerapan cahaya dengan konsentrasi larutan merupakan prinsip dasar dari penggunaan spektrofotometer yang menggunakan cahaya monokromatik (Seitz, 1987).

2.4.5. Faktor yang Mempengaruhi Terbentuknya Klorofil

Terjadinya klorofil dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu factor pembawa (gen), jika gen ini tidak ada, tanaman akan tampak putih (albino). Factor kedua adalah cahaya. Jika cahaya terlalu kuat, klorofil akan berkurang hijaunya. Factor yang ketiga adalah oksigen dan factor lainnya adalah karbohidrat, nitrogen, magnesium, mangan, coprum, zink, air, dan temperature (Dwijoseputro, 1985).

Pembentukan klorofil dalam tubuh tumbuhan dipengaruhi oleh beberapa factor antara lain : factor pembawaan (gen), cahaya, oksigen, karbohidrat, nitrogen, magnesium dan besi serta air dan temperature, dimana temperature yang baik untuk pembentukan klorofil yaitu 3-48oC (Dwijoseputro, 1994)

Klorofil dibentuk dari kondensasi suksinil Co-A dan asam amino glisin menjadi senyawa yang tidak stabil yaitu asam amino glisin menjadi senyawa asam amino ketoda di dapat, kemudian melalui dekarboksilasi dan diubah menjadi asam amino lovalenat dikatalis oleh enzim amino lovalenat sintetase dengan adanya pridoksal posfat dan cahaya (Nurdin, 1997).