

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. Dalam analisis cara spektrofotometri terdapat tiga daerah panjang gelombang elektromagnetik yang digunakan, yaitu daerah UV (200-380 nm), daerah Visible (380-700 nm), daerah Inframerah (700-3000 nm). Salah satu prinsip kerja spektrofotometri didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh space kimia tertentu didaerah ultra violet dan sinar tampak (*visible*).

(Agustina Ayu.2012)

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.

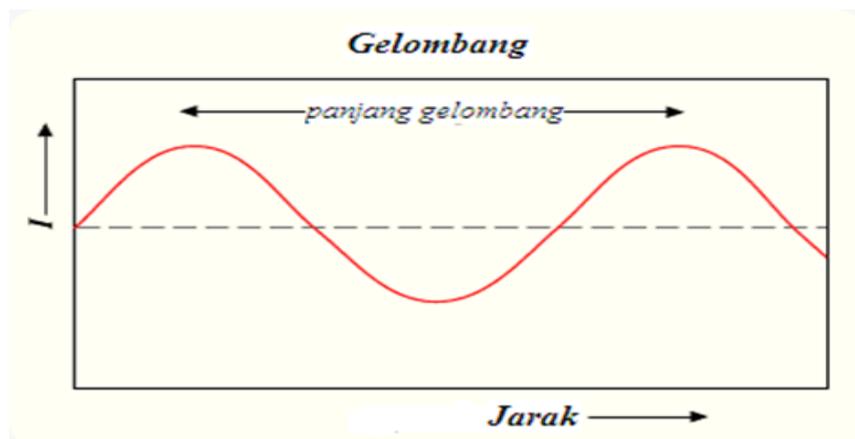
Cahaya atau sinar tampak adalah radiasi elektromagnetik yang terdiri dari gelombang. Seperti semua gelombang, kecepatan cahaya, panjang gelombang dan frekuensi dapat didefinisikan sebagai : $C = V \cdot \lambda$

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)

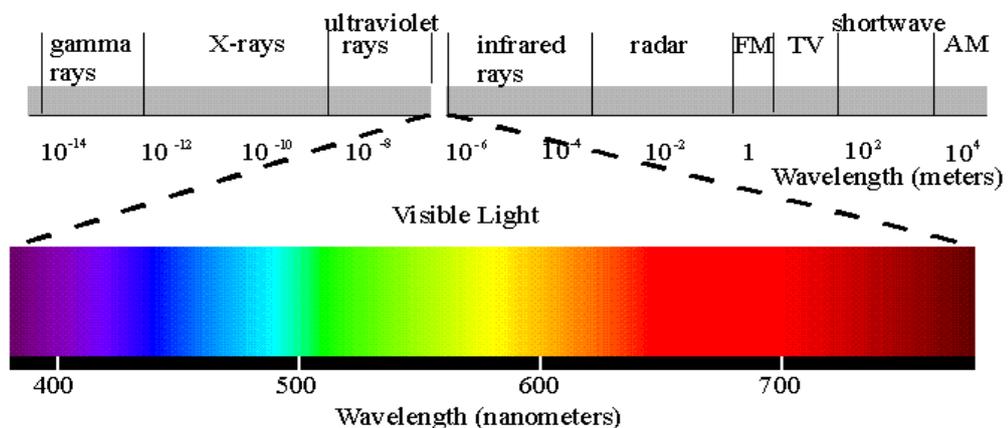
Cahaya/sinar tampak terdiri dari suatu bagian sempit kisaran panjang gelombang dari radiasi elektromagnetik dimana mata manusia sensitif. Radiasi dari panjang gelombang yang berbeda ini dirasakan oleh mata kita sebagai warna berbeda, sedangkan campuran dari semua panjang gelombang tampak seperti sinar 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 : $E = h \cdot \nu$

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

Tabel 2. Panjang Gelombang Berbagai Warna Cahaya

λ (nm)	Warna yang 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 :

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

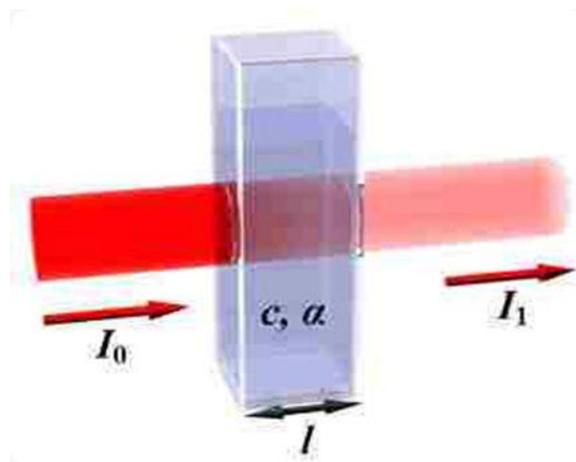
Umumnya digunakan dua satuan c (konsentrasi zat yang menyerap) yang berlainan, yaitu gram per liter atau mol per liter. Nilai tetapan (k) dalam hukum Lambert-Beer tergantung pada sistem konsentrasi mana yang digunakan. Bila c dalam gram per liter, tetapan disebut dengan absorptivitas (a) dan bila dalam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

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

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”.

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.

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 Mawar Merah (*Rosa hybrid*)

Mawar umumnya merupakan tanaman semak yang berduri yang tingginya bisa mencapai 2 sampai 5 meter. Sebagian besar spesies mempunyai daun yang panjangnya antara 5–15 cm dengan dua-dua berlawanan (*pinnate*). Daun majemuk yang tiap tangkai daun terdiri dari paling sedikit 3 atau 5 hingga 9 atau 13 anak daun dan daun penumpu (*stipula*) berbentuk lonjong, pertulangan menyirip, tepi tepi beringgit, meruncing pada ujung daun dan berduri pada batang yang dekat ke tanah. Sebagian besar spesies merontokkan seluruh daunnya dan hanya beberapa spesies yang ada di Asia Tenggara yang selalu berdaun hijau sepanjang tahun. Klasifikasi taksonomi bunga mawar merah sebagai berikut :

Kingdom / Kerajaan	: Plantae
Subkingdom / Subkerajaan	: Tracheobionta
Superdivision / Super Divisi	: Spermatophyta
Division / Divisi	: Magnoliophyta
Class / Kelas	: Magnoliopsida
Subclass / Sub kelas	: Rosidae
Order / Ordo	: Rosidales
Family / Famili	: Rosaceae
Genus / Marga	: <i>Rosa</i>
Species / Spesies	: <i>Rosa hybrida</i>



Gambar 3. Bunga Mawar Merah
(Anonim, 2015)

Secara umum, kandungan nutrisi dari mawar merah dapat dilihat pada

Tabel 4 dibawah :

Tabel 4. Kandungan Nutrisi pada mawar merah per 100 gram

Komponen	Kadar
Air	86,2 gr
Protein	1,6 gr
Lemak	0,1 gr
Karbohidrat	11,1 gr
Serat	2,5 gr
Abu	1,0 gr
Kalsium	160 mg
Fosfor	60 mg
Besi	3,8 mg
Vitamin C	214,68 mg
Thiamin	0,04 mg
Reboflavin	0,6 mg
Antosianin	195 mg

Sumber : Maryani dan Kristiana (2005)

Bunga mawar merah banyak dipergunakan sebagai bunga potong, baik di perkantoran, hotel, maupun di rumah penduduk. Padahal jika telah berumur 3-4 hari, bunga tersebut akan layu dan kehilangan daya tarik sehingga harganya jatuh. Menurut Saati (2001) dalam bunga mawar yang telah layu masih mengandung pigmen antosianin.

2.3 Antosianin

Antosianin berasal dari bahasa Yunani, anthos yang berarti bunga dan kyanos yang berarti biru gelap. Antosianin merupakan pigmen larut air, tersebar luas dalam bunga dan daun, dan menghasilkan warna dari merah sampai biru. Zat pewarna alami antosianin tergolong ke dalam turunan benzopiran. Struktur utama turunan benzopiran ditandai dengan adanya dua cincin aromatik benzena (C_6H_6) yang dihubungkan dengan tiga atom karbon yang membentuk cincin (Zain, 2013).

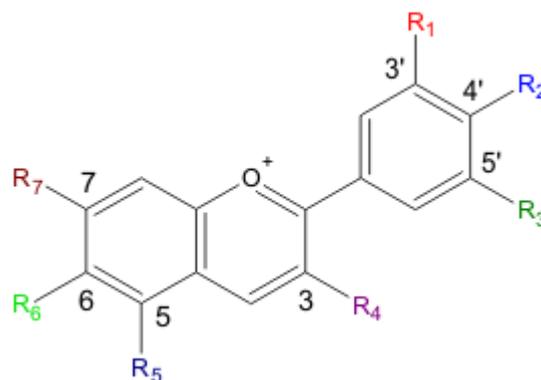
Antosianin terbagi atas tiga kelompok yaitu antosianidin, aglikon dan glukosida. Antosianidin yang merupakan inti aglikon dari antosianin menyebabkan terbentuknya warna merah, biru dan kuning pada sayuran dan buah-buahan. Kestabilan antosianin di dalam makanan tergantung pada banyak faktor. Proses pemanasan merupakan faktor terbesar yang menyebabkan kerusakan antosianin. Proses pemanasan terbaik untuk mencegah kerusakan antosianin adalah dengan suhu tinggi tetapi dalam jangka waktu yang pendek (Astawan dan Kasih, 2008).

Antosianin merupakan molekul yang tidak stabil. Warna ungu, merah atau biru yang terdapat pada antosianin dapat berubah karena beberapa faktor antara lain yaitu faktor suhu, pH, oksigen, penambahan gula, asam dan adanya ion logam (Tensiska *et al*, 2007). Menurut Muchtadi dan Sugiyono (1992) bahwa pengaruh pH pada antosianin sangat besar terutama pada penentuan warnanya. Pada pH rendah (asam), antosianin memiliki warna merah. pH netral memiliki warna biru dan pH tinggi (basa) memiliki warna putih.

Antosianin adalah salah satu bagian penting dalam kelompok pigmen setelah klorofil. Antosianin larut dalam air, menghasilkan warna dari merah

sampai biru dan tersebar luas dalam buah, bunga, dan daun. Antosianin umumnya ditemukan pada buah-buahan, sayuran, dan bunga, contohnya pada kol merah, anggur, strawberry, cherry, dan sebagainya (Hernani, 2007).

Zat warna ini terdapat pada air sel vakuola. Biasanya larut di dalamnya. Antosianin tersebut merupakan suatu glikosida. Jika kehilangan gulanya, yang tersisa tinggal antosianidin. Zat ini berwarna merah di lingkungan asam, berwarna biru di lingkungan basa dan berwarna ungu di lingkungan netral. Pembentukan antosianin memerlukan gula seperti halnya pada pembentukan klorofil (Hernani, 2007).



Gambar 4. Struktur kimia antosianin (Zain, 2013)

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponen tersebut. Sebagai contoh adalah ekstraksi minyak dari kopra atau biji, ekstraksi nira dari batang tebu, ekstraksi karoten dari buah-buahan, ekstraksi cairan buah dari buah-buahan dan sebagainya. Komponen yang dipisahkan dengan ekstraksi dapat berupa padatan dari suatu sistem campuran padat-cair, berupa cairan dari suatu sistem campuran cair-cair (Suyitno, et al. 1989).

Pemisahan atau pengambilan komponen dari bahan sumbernya pada dasarnya dapat dilakukan dengan penekanan atau pengempaan, pemanasan dan menggunakan pelarut. Ekstraksi dengan pengempaan atau pemanasan dikenal dengan cara mekanis. Ekstraksi cara mekanis hanya dapat dilakukan untuk pemisahan komponen dalam sistem campuran padat-cair. Sebagai contoh adalah ekstraksi minyak dari biji-bijian. Dalam hal ini minyak adalah cair dan ampasnya sebagai padatan (Suyitno, et al. 1989).

Ekstraksi dengan pengempaan, tekanan yang diberikan selama pengempaan akan mendorong cairan terpisah dan keluar dari sistem campuran padat-cair. Tekanan yang diberikan terhadap campuran padat-cair akan menimbulkan beda tekanan antara cairan dalam bahan dan campuran dalam suatu wadah dengan tekanan diluar campuran atau diluar wadah. Beda tekanan akan mengakibatkan cairan terekstrak. Jumlah ekstrak yang dihasilkan dengan ekstraksi menggunakan penekanan atau pengempaan, dipengaruhi beberapa faktor antara lain besar kecilnya hancuran bahan, waktu yang disediakan pada saat tekanan maksimum, besarnya tekanan yang diberikan, kekentalan yang diekstrak, cara pengempaan yang dilakukan (Suyitno, et al. 1989).

Ekstraksi menggunakan pelarut berdasarkan sifat kelarutan dari komponen di dalam pelarut yang digunakan. Komponen yang larut dapat berbentuk padat maupun cair, dipisahkan dari benda padat atau cair. Ekstraksi padat cair, komponen yang dipisahkan berasal dari benda padat. komponen yang diekstraksi dapat berupa protein, vitamin, minyak atsiri, zat warna, dan sebagainya yang berasal dari bahan.

Ekstraksi bertujuan untuk mengambil komponen yang larut dalam pelarut, maka perlu dilakukan pemilihan pelarut yang selektif, yaitu pelarut yang dapat

melarutkan komponen yang akan diambil atau dipisahkan. (Suyitno, et al. 1989). Ekstraksi menggunakan pelarut air komponen lain yang ikut terekstrak tidak dapat dihindarkan, akibatnya komponen yang terekstrak bukan merupakan komponen yang murni. Pelarut yang dipilih harus memiliki viskositas yang cukup rendah sehingga mudah disirkulasikan.

Semakin lama proses ekstraksi berlangsung konsentrasi komponen yang terlarut dalam pelarut makin besar, akibatnya kecepatan ekstraksi makin menurun. Kecepatan ekstraksi menunjukkan kecepatan perpindahan solut dari satu fase ke fase yang lain. Ekstraksi tergantung dari beberapa faktor antara lain yaitu ukuran partikel, jenis zat pelarut, suhu dan pengadukan (Suyitno, et al. 1989).