

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Spektrofotometer

2.1.1 Pengertian Spektrofotometri

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*). Sedangkan peralatan yang digunakan dalam spektrofotometri disebut spektrofotometer. Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi suatu larutan.

Spektrofotometer terdiri dari beberapa jenis yaitu spektrofotometer *visible* (sinar tampak), spektrofotometer UV (Ultra Violet), spektrometer infra-merah, spektrofotometer resonansi magnet inti, spektrofotometer serapan, spektrofotometer massa, dan spektrometer fluoresensi. Perbedaan dari jenis spektrometer tersebut terletak pada sumber cahaya atau sampel yang disesuaikan dengan apa yang akan diteliti.

(Agustina Ayu.2012)

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 serta 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 subjektif akan ketampakan (*visible*). (A.L.Underwood dan R.A.Day Jr, 2002)

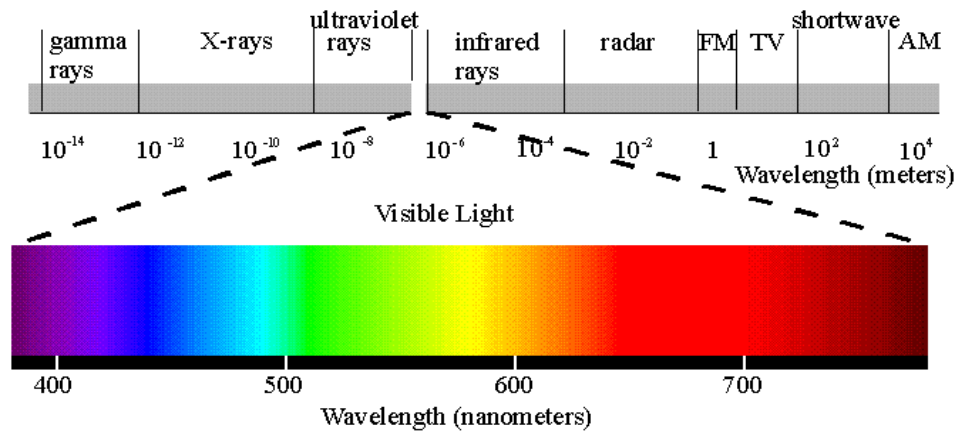
Cahaya/sinar tampak terdiri dari suatu bagian sempit kisaran panjang gelombang dari radiasi elektromagnetik dimana mata manusia sensitif. Radiasi dari panjang gelombang yang berbeda ini dirasakan oleh mata kita sebagai warna berbeda, sedangkan campuran dari semua panjang gelombang tampak seperti sinar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

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 didalam 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: Underwood, 2002)

2.1.3 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 yang 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, 2002; 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:

$$A = A_1^1 \cdot b \cdot c$$

Dimana: A_1^1 = absorptivitas spesifik

b = ketebalan sel

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

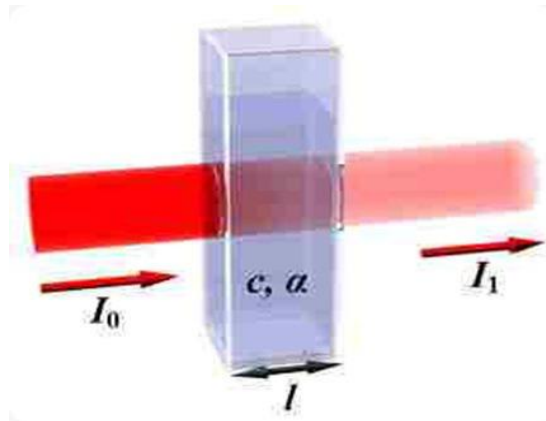
2.1.4 Proses Absorpsi Cahaya pada Spektrofotometri

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, yang 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 yaitu:

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

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.

Rumus yang diturunkan dari Hukum Beer dapat ditulis sebagai:

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

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 1cm)

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.

2.1.5 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 yang 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, 2002).

2.2 Paprika (*Capsicum annum L.*)

Paprika (*Capsicum annum L.*) adalah sejenis cabai yang berasa manis dan sedikit pedas. Buahnya besar dan gemuk seperti buah kesemek. Paprika merupakan sejenis tumbuhan yang batang pokoknya mempunyai dahan–dahan yang padat. Tinggi batangnya antara 0.5–1.5 meter (20–60 inci). Bunga-bunganya yang tunggal dan berwarna putih. Spesies ini dapat tahan dengan kebanyakan iklim, bahkan sangat produktif di kawasan beriklim panas dan kering. Benihnya banyak didatangkan dari luar negeri, antara lain Jepang dan Taiwan. Paprika berasal dari Amerika Selatan dan banyak dikembangkan di Hungaria. Di Indonesia, paprika cukup dikenal, tanaman ini banyak dikembangkan secara hidroponik di Jawa, Bali dan Nusa Tenggara Barat. Buah paprika ini terdapat tiga jenis yaitu paprika merah, kuning dan hijau (Astawan, 2009)

Klasifikasi Ilmiah Paprika (*Capsicum annum L.*) yaitu :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta (tanaman berbiji)
Subdivisi	: Angiospermae (biji berada dalam buah)
Kelas	: Dicotyledoneae (biji berkeping dua atau belah)
Ordo	: Solanales
Familia	: Solanaceae

Genus : *Capsicum*

Spesies : *C. annuum*

Nama binomial : *Capsicum annuum L*

Adapun kandungan gizi pada jambu biji merah dapat dilihat dalam tabel berikut:

Tabel 3. Kandungan Gizi dalam 100 gram Paprika

Komponen Gizi	Jumlah	Komponen Gizi	Jumlah
Energi	26 kcal	Tembaga	0,22 mg
Protein	0,99 g	Mangan	0,11 mg
Lemak Total	0,3 g	Selenium	0,1 mg
Karbohidrat	6,03 g	Vitamin C	190 mg
Serat	2 g	Vitamin B1	0,05 mg
Gula	4,2 g	Vitamin B2	0,09 mg
Kalsium	7 mg	Vitamin B3	0,98 mg
Zat Besi	0,43 mg	Vitamin B6	0,29 mg
Magnesium	12 mg	Beta Karoten	25 mg
Fosfor	26 mg	Folat	18 mcg
Kalium	211 mg	Vitamin A	3,131 IU
Natrium	2 mg	Vitamin E	1,58 mg
Seng	0,25 mg	Vitamin K	4,9 mcg

(Lanny Lingga, 2010)

Kandungan gizi yang paling umum pada paprika adalah karoten, vitamin B serta vitamin C. Salah satu pigmen yang ada dalam buah dan sayuran adalah pigmen karoten yang berwarna dominan merah-jingga yang ditemukan secara alami. Pigmen karoten terdiri atas beberapa macam, salah satunya adalah β -karoten. Paprika juga kaya akan vitamin A dan betakaroten. β -karoten yang terkandung di dalam paprika bekerja sebagai antioksidan karena sanggup menstabilkan radikal berinti karbon. Karena β -karoten efektif pada konsentrasi rendah oksigen, maka dapat melengkapi sifat antioksidan vitamin E yang efektif pada konsentrasi tinggi oksigen. β -karoten juga dikenal sebagai unsur pencegah kanker, khususnya kanker kulit dan paru. β -karoten dapat menjangkau lebih

banyak bagian-bagian tubuh dalam waktu relatif lebih lama dibandingkan vitamin A, sehingga memberikan perlindungan lebih optimal terhadap munculnya kanker. Sebagian besar kandungan β -karoten paprika terkonsentrasi pada bagian di dekat kulit. Sama seperti sayuran lainnya, semakin tua warna paprika, β -karoten yang terkandung di dalamnya semakin banyak. Untuk menentukan kadar β -karoten dalam bahan dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. (Citra.2011)

2.3 β -karoten

Beta-karoten (β -karoten) adalah zat kimia alami yang terdapat dalam buah-buahan dan sayuran yang berwarna merah-orange-kuning-jingga dan hijau tua. Seperti wortel, ubi jalar, mangga, pepaya, paprika, brokoli, bayam dan lain-lain. Zat karoten inilah yang membuat buah dan sayur itu menjadi berwarna seperti itu. 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 adalah salah satu jenis senyawa hidrokarbon karotenoid yang merupakan senyawa golongan tetraterpenoid.

β -karoten merupakan anggota karoten. 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. Karoten merupakan salah satu senyawa pigmen dari tumbuhan ataupun hewan. Pada hewan, karotenoid terikat pada lipid sebagai lipochrome. Sedangkan pada tumbuhan karotenoid terdapat sebagai pigmen berwarna kuning atau oranye. Makanan yang kaya dengan

β -karoten mungkin mempunyai warna selain kedua warna tersebut. Hal tersebut disebabkan karena pigmen fitonutrien lainnya berbau bersama dengan β -karoten sehingga memberikan warna yang unik. 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 adanya pemanasan akan dapat merusak mol karotenoid sehingga warna dan potensi vitamin A berubah.

(Ali.2011)