

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

2.1.1. Pengertian Rosella

Rosela merupakan tumbuhan semak umur satu tahun, tinggi tumbuhan mencapai 2,4 m, Batang berwarna merah, berbentuk bulat dan berbulu, daun berseling 3-5 helai dengan panjang 7,5-12,5 cm berwarna hijau, ibu tulang daun kemerahan, tangkai daun pendek. Bentuk helaian daun bersifat anisofili (polimorfik), helaian daun yang terletak di bagian pangkal batang tidak berbagi, bentuk daun bulat telur, tangkai daun pendek. Daun-daun di bagian cabang dan ujung batang berbagi, menjadi 3 toreh, lebar toreh daun 2,5 cm, tepi daun beringgit, daun penumpu bentuk benang; panjang tangkai daun 0,3-12 cm, hijau hingga merah; pangkal daun meruncing, tepi daun beringgit, pangkal daun tumpul hingga meruncing, sedikit berambut. Bunga tunggal, kuncup bunga tumbuh dari bagian ketiak daun, tangkai bunga berukuran 5-20 mm; kelopak bunga berlekatan, tidak gugur, tetap mendukung buah, berbentuk lonceng; mahkota bunga berlepasan, berjumlah 5 petal, mahkota bunga berbentuk bulat telur terbalik, warna kuning, kuning kemerahan, benang sari terletak pada suatu kolom pendukung benang sari, panjang kolom pendukung benang sari sampai 20 mm, kepala sari berwarna merah, panjang tangkai sari 1 mm; tangkai putik berada di dalam kolom pendukung benang sari, jumlah kepala putik 5 buah, warnamerah. Buah kapsul, berbentuk bulat telur, ukuran buah 13-22 mm x 11-20 mm, tiap buah berisi 30-40 biji. Ukuran biji 3-5 mm x 2-4 mm, warna coklat kemerahan. (Andriansyah,2015)

2.1.2. Klasifikasi

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Subkelas : Dilleniidae

Bangsa : Malvales

Suku : Malvaceae

Marga : Hibiscus

Jenis : *Hibiscus sabdariffa* Linn.



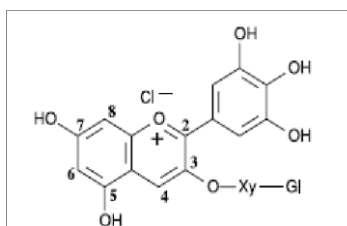
Habitat aslinya berasal dari Nigeria, tetapi tumbuh berkembang diseluruh dunia, terutama daerah tropis. Tanaman ini banyak dibudidayakan di Eropa. Rosela di Indonesia dikenal dengan nama daerah gamet walanda (Sunda), kasturi roriha (Ternate). (Andriansyah,2015)

2.1.3. Penggunaan Secara Tradisional

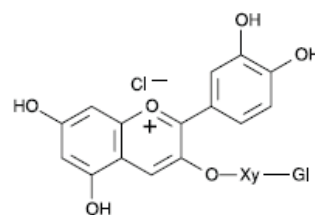
Serat batang rosela secara tradisional digunakan sebagai bahan pembuatan karung goni, daun digunakan untuk kosmetik dan makanan, sedangkan bijinya untuk peluruh air seni, gangguan pencernaan dan makanan. Kelopak bunga rosela berkhasiat sebagai obatmual. Bagian tanaman yang berkhasiat adalah bunga. Seduhan bunga rosela memiliki efek memperlancar buang air besar. Bunga rosela banyak digunakan untukmengurangi nafsu makan, gangguan pernafasan yang disebabkan flu, dan rasa tidak enak di perut. Rosela digunakan untuk mengatasi bisul dan radang pada kulit, luka bakar, sariawan, dan infeksi herpes zoster. (Ardiansyah, 2015)

2.1.4. Kandungan Kimia

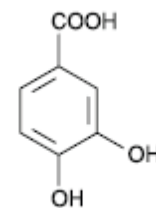
Kandungan kimia tanaman ini adalah alohidroksi asam sitrat lakton, asam malat dan asam tartrat. Antosian yang menyebabkan warna merah pada tanaman ini mengandung delfinidin-3-siloglukosida, delfinidin-3-glukosida, sianidin-3-siloglukosida, sedangkan flavonoidnya mengandung gosipetin dan mucilago (rhamnogalakturonan, arabinogalaktan, arabinan).



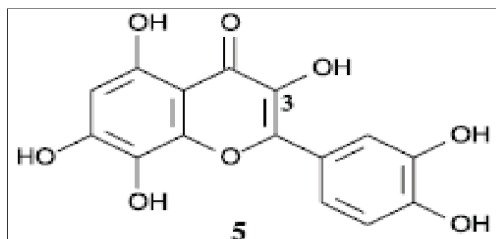
delfinidin-3-sambubiosida



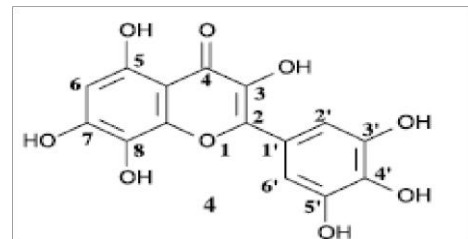
sianidin-3-sambubiosida



asam protokatekuat



gosipitrin



hibisetin

Sterol minyak biji rosela terdiri atas 61,3% β -sitosterol, 16,5% kampasterol, 5,1% kolesterol, dan 3,2% ergosterol.⁷ Karkade (bunga kering tanpa ovari) mengandung 13% campuran asam sitrat dan asam malat, dua antosianin; gosipetin (hidroksiflavon) dan hibiskin, asam askorbat 0,004-0,005%. Mahkota bunga mengandung glikosida-flavon hibiskritin, yang mengandung aglikon hibisketin. Bunga rosela juga mengandung fitosterol. Bunga kering mengandung 15,3% asam hibiskat. Akar rosela mengandung saponin dan asam tartrat. (Ardiansyah, 2015)

2.1.5. Kandungan Nutrisi Rosela

Tabel 1. Kandungan senyawa kimia dalam kelopak bunga rosela

Nama Senyawa	Jumlah
Asam sitrat dan asam malat	13%
Anthocyanin yaitu gossipetin (hydroxyflavone) dan hibscin	2% 0,004-0,005%
Vitamin C	-
Protein	-
Berat segar	6,7%
Berat kering	7,9%
Falvonol gossypetine	-
Hibiscetine dan sabdaretine	-
Delphinidin 3-monoglucoside	-
Cyanidin 3-monoglucoside	-
Delphinidin	-

(Candra, 2010)

Keterangan : Hibscin merupakan pigmen utama yang terdapat didalam kelopak bunga. Pigmen tersebut telah diidentifikasi dengan nama Daphniphylline. Sementara itu akar rosella mengandung saponin dan asam tartrat.

Bahan penting lainnya yang terkandung dalam tanaman rosela adalah gossy peptin-anthocyanin dan glucoside hibiscin. Ketiga zat inilah yang menjadikan rosela bukan sekedar tanaman hias yang indah, tetapi juga berkhasiat bagi kesehatan manusia. Selain mengandung vitamin C, kelopak bunga rosella juga mengandung vitamin A dan 18 jenis asam amino yang

diperlukan tubuh. Salah satunya adalah arginin yang berperan dalam proses peremajaan sel tubuh. Di samping itu, rosela juga mengandung protein, kalsium, dan unsur-unsur lain yang berguna bagi tubuh. Kandungan zat lainnya yang terdapat pada tanaman rosela, dapat dilihat pada tabel nilai gizi berikut (Candra, 2010)

Tabel 2. Nilai Gizi dalam 100 gram kelopak bunga rosela :

Zat	Kandungan Gizi
Air	9,2 gr
Protein	1,145 gr
Lemak	2,61 gr
Serat	12,0 gr
Karbohidrat	8,88 gr
Abu	6,90 gr
Kalsium	1,296 mg
Fosforus	273,2 mg
Zat Besi	8,89 mg
Betakaroten	0,023 mg
Vitamin C	11,2 mg
Thiamine	0,117 mg
Riboflavin	0,277 mg
Niacin	3,765 mg
Asid Askorbik	6,7 mg
Kalori	35,2 kal

(Candra, 2010)

Tabel 3. Kandungan gizi rosela

Kandungan	100 gr buah segar	100 gr kelopak segar
Kalori	49 kal	44 kal
Air	84,5%	86,2%
Protein	1,9 gr	1,6 gr
Lemak	0,1 gr	0,1 gr
Karbohidrat	12,3 gr	11,1 gr
Serat	2,3 gr	2,5 gr
Abu	1,2 gr	1,0 gr
Kalsium	2,3 gr	160 mg
Fosfor	57 mg	60 mg
Besi	2,9 mg	3,8 mg
Betakaroten	300 ig	285 ig
Vitamin C	14 mg	14 mg
Tiamin	-	0,04 mg
Riboflavin	-	0,6 mg
Niasin	-	0,5 mg

(Candra, 2010)

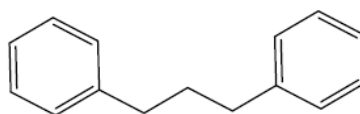
Tabel 4. Kandungan asam lemak dalam biji rosela

Jenis Asam Lemak	Jumlah
Asam palmanin	35,2%
Asam oleat	34%
Asam linoleat	14,4%

(Candra, 2010)

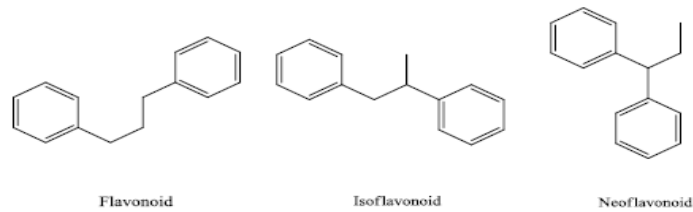
2.2. Flavonoid

Flavonoid adalah sebuah kelas metabolit sekunder tanaman. Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga, dan *hornwort*. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah buni, dan biji. Hanya sedikit saja catatan yang melaporkan adanya flavonoid pada hewan, misalnya dalam kelenjar bau berang-berang, „propolis” (sekresi lebah) dan di dalam sayap kupu-kupu; itu pun dengan anggapan bahwa flavonoid tersebut berasal dari tumbuhan yang menjadi makanan hewan tersebut dan tidak di biosintesis di dalam tubuh mereka (Markham, 1988). Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mengandung C₁₅ terdiri dari dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon. Golongan flavonoid dapat juga digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆. Artinya, kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Kerangka dasar flavonoid ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka dasar flavonoid (Robinson, 1995).

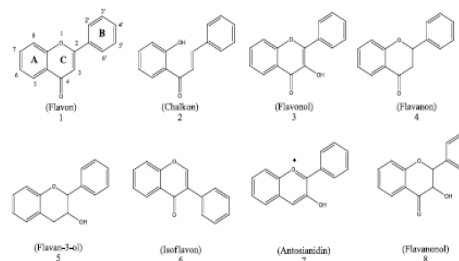
Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yaitu flavonoid (1,3-diaril propana), isoflavonoid (1,2-diaril propana), neoflavonoid (1,1-diaril propana) seperti ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Tiga jenis flavonoid (Achmad, 1986).

Menurut Harborne (1987) dan Markham (1988) flavonoid yang terdapat pada tanaman dapat digolongkan menjadi dua yaitu glikosida dan aglikon. Glikosida merupakan flavonoid yang mengandung gugusan gula dan cenderung bersifat polar sehingga mudah larut dalam air, metanol, etanol, dan lain-lain. Aglikon sendiri merupakan flavonoid tanpa gugusan gula terikat, aglikon yang kurang polar ini lebih larut dalam pelarut eter dan kloroform. Aglikon yang kurang polar tersebut antara lain isoflavan, flavanon, flavon, dan flavonol termetoksilasi. Menurut Achmad (1986) suatu bentuk glikosida akan terurai menghasilkan gugus gula dan aglikon apabila dihidrolisis oleh asam. Glikosilasi menyebabkan flavonoid kurang efektif dan lebih mudah larut dalam air sehingga memungkinkan penyimpanan flavonoid (termasuk antosianin) di dalam vakuola sel, tempat di mana flavonoid bisa ditemukan (Markham, 1988).

Senyawa flavonoid terdiri dari beberapa jenis, tergantung pada tingkat oksidasi rantai propana dari sistem 1,3-diaril propana. Struktur kimia dari beberapa jenis flavonoid ditunjukkan pada Gambar 3.

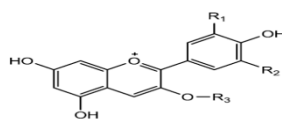


Gambar 3. Struktur kimia dari beberapa jenis flavonoid (Tapas *et al.*, 2008).

2.2.1 Antosianin

Antosianin ialah pigmen daun bunga merah sampai biru yang biasa, (meskipun apigenidin kuning), banyaknya sampai 30% bobot kering dalam beberapa bunga. Antosianin terdapat juga dalam bagian lain tumbuhan tinggi dan seluruh dunia tumbuhan kecuali fungus. Tidak seperti golongan flavonoid lain, antosianin tampaknya selalu terdapat dalam bentuk glikosida kecuali aglikon antosianidin (Robinson, 1995).

Antosianidin adalah aglikon antosianin yang terbentuk bila antosianin dihidrolisis dengan asam. Antosianidin yang paling umum dikenal adalah sianidin yang berwarna merah lembayung. Warna jingga disebabkan oleh pelargonidin yang gugus hidroksilnya kurang satu dibandingkan sianidin, sedang warna merah senduduk, lembayung, dan biru umumnya disebabkan oleh delphinidin yang gugus hidroksilnya lebih satu dibandingkan sianidin. Tiga jenis ester metil antosianidin juga sangat umum, yaitu peonidin yang merupakan turunan sianidin serta petunidin dan malvidin yang terbentuk dari delphinidin. Masing-masing antosianidin tersebut sebagai sederetan glikosida (yaitu sebagai antosianin) dengan berbagai gula yang terikat. Keragaman utama adalah sifat gulanya (sering kali glukosa, tetapi mungkin juga galaktosa, ramnosa, xilosa, atau arabinosa), jumlah satuan gula (mono-, di-, atau triglikosida), dan letak ikatan gula (biasanya pada 3-hidroksi atau pada 3- dan 5-hidroksi) (Harborne, 1996). Kerangka dasar antosianin dan jenis-jenis aglikon antosianin yang biasa ditemukan pada tanaman ditampilkan pada Gambar 4



Gambar 4. Kerangka dasar antosianidin dengan substituen yang berbeda.

Antosianin merupakan bentuk flavonoid yang paling teroksidasi, dengan cincin karbon yang sepenuhnya tidak jenuh dan memiliki gugus hidroksil pada posisi 3. Struktur dasarnya adalah suatu aglikon, atau antosianidin, dengan satu atau lebih gula yang terikat, biasanya pada C3, C5, atau C7 dan memiliki kemungkinan esterifikasi pada gula. Saat ini telah ditemukan 19 jenis antosianidin yang terdapat di alam. 6 jenis antosianidin yang paling umum terdapat pada tanaman-tanaman pangan yaitu, pelargonidin, peonidin, cyanidin, malvidin, petunidin, dan delphinidin. Peonidin dan sianidin tersubstitusi pada posisi 3" dan 4"; petunidin, malvidin dan delphinidin tersubstitusi pada posisi 3", 4", dan 5"; sedangkan pelargonidin hanya tersubstitusi pada satu posisi (Welch *et al.*, 2008).

Sifat fisika dan kimia dari antosianin dilihat dari kelarutan antosianin larut dalam pelarut polar seperti metanol, aseton, atau kloroform, terlebih sering dengan air dan diasamkan dengan asam klorida atau asam format (Socaciu, 2007). Antosianin stabil pada pH 3,5 dan suhu 50°C mempunyai berat molekul 207,08 gram/mol dan rumus molekul C₁₅H₁₁O (Fennema, 1996). Antosianin dilihat dari penampakan berwarna merah, ungu dan biru mempunyai panjang gelombang maksimum 515-545 nm, bergerak dengan eluen BAA (n-butanol-asam asetat-air) (Harborne, 1996).

Sumber senyawa antosianin selain yang telah ditampilkan pada Tabel 1, yaitu Manggis (Chaovanalikit *et al.*, 2012), kopi (Murthy *et al.*, 2012), buah senggani (Kristiana dkk., 2012), *blackberry* dan *sweet cherry* (Oancea *et al.*, 2013), bunga rosella (Moulana *et al.*, 2012), buah sikaduduk (Arja dkk., 2013), wortel hitam (Turker *et al.*, 2004), buah arben (Tensiska dkk., 2007), buah salam (Ariviani, 2010) dll.

Antosianin telah dimasukkan ke dalam pola makan manusia sejak beberapa abad yang lalu. Antosianin merupakan komponen dalam obat-obatan herbal tradisional yang digunakan oleh suku Indian di Amerika Utara, Eropa, dan Cina, dan biasanya didapatkan dari daun yang dikeringkan, buah-buahan (*berry*), akar, atau biji. Campuran atau ekstrak yang kaya kandungan antosianin (walaupun belum dimurnikan), sejak dahulu telah digunakan untuk mengobati kondisi yang bermacam-macam, seperti hipertensi, pileksia, kelainan pada hati, disentri dan diare, permasalahan saluran urin seperti batu ginjal dan infeksi saluran kemih, serta demam biasa. Antosianin bahkan telah dikembangkan untuk memperbaiki pengelihatn dan sirkulasi darah (Konczak and Zhang, 2004).

2.3. Teknik Isolasi Antosianin

1. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi padat-cair. Prinsip teknik ini yaitu sampel ditempatkan dalam suatu wadah yang tertutup, dan selanjutnya ditambahkan pelarut yang dapat melarutkan analit yang diinginkan. Sampel dibiarkan berada dalam pelarut selama beberapa jam hingga satu malam hingga ekstraksi berjalan optimal. Selama proses maserasi, sampel diaduk secara berkala. Selanjutnya larutan dipisahkan dari padatan sampel dengan menggunakan kertas saring atau dapat juga didekantir atau disentrifugasi untuk memisahkan larutan dari padatan yang tidak larut (Settle, 1997).

2. Freeze Drying

Kadar air dalam suatu sampel atau ekstrak seringkali memiliki efek yang nyata dan mengganggu dalam proses pemurnian suatu senyawa organik.

Perlakuan standar yang biasa dilakukan adalah pengeringan sampel dengan menggunakan oven hingga didapatkan bobot yang konstan. Namun, sampel biologis sebaiknya tidak dipanaskan lebih dari 100°C sehingga kandungan senyawa didalamnya tidak terdekomposisi atau hancur. *Freeze drying* atau liofilisasi adalah suatu metode pengeringan sampel tanpa menggunakan panas. Metode ini cocok dilakukan untuk sampel yang sensitif terhadap panas, sampel yang mengandung senyawa yang mudah teroksidasi dalam kondisi panas (termolabil), atau sampel yang memiliki kandungan analit yang volatil. *Freeze drying* mula-mula dilakukan dengan membekukan sampel, selanjutnya kandungan air di dalamnya dikeluarkan dari sampel yang beku tersebut dengan bantuan vakum (Settle, 1997).

3. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah teknik pemisahan dua atau lebih senyawa atau ion dengan cara distribusi senyawa tersebut diantara dua fase, yang satu bergerak, dan fase yang lainnya diam. Kedua fase ini dapat berupa padat-cair, cair-cair, gas-padat, atau gas-cair. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah jenis kromatografi padat-cair, dengan fasa diamnya biasanya absorbent polar dan fasa geraknya dapat berupa satu jenis pelarut atau berupa campuran. KLT merupakan teknik pemisahan skala mikro yang cepat dan murah yang dapat digunakan untuk :

- Menentukan jumlah komponen dalam campuran
- Menguji identitas suatu senyawa
- Memantau perkembangan suatu reaksi
- Menentukan kondisi yang cocok untuk kromatografi kolom
- Menganalisa fraksi yang didapatkan dari kromatografi kolom

4. Partisi (ekstraksi cair-cair)

Ekstraksi cair-cair adalah salah satu teknik pemisahan yang penting digunakan dalam lingkungan, klinik, dan laboratorium industri. Dalam ekstraksi cair-cair sederhana, zat terlarut dipartisi diantara dua fase yang tidak saling bercampur. Biasanya fase yang satu adalah fase air, dan fase lainnya adalah fase pelarut organik, seperti dietil eter atau kloroform. Kedua fase tersebut tidak bercampur, sehingga terbentuklah dua lapisan, dan fase yang memiliki masa jenis lebih besar berada di bawah. Pada awalnya, zat terlarut hanya berada dalam satu fase, tetapi setelah ekstraksi zat terlarut terbagi menjadi terlarut dalam dua fase (Harvey, 2000).

5. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah teknik pemisahan yang umum dan sangat berguna dalam kimia organik. Metode pemisahan ini memiliki prinsip yang sama dengan KLT, tapi dapat diaplikasikan untuk memisahkan sampel dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan KLT. Kromatografi kolom dapat digunakan baik dalam skala besar maupun skala kecil. Teknik ini dapat diaplikasikan pada berbagai disiplin ilmu, seperti biologi, biokimia, mikrobiologi, dan obat-obatan. Banyak jenis antibiotik yang telah dimurnikan dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom memungkinkan kita untuk memisahkan dan mengumpulkan masing-masing senyawa dalam *beaker glass* yang berbeda-beda. Sebagaimana pada metode KLT, alumina dan silika gel merupakan fasa diam yang paling populer digunakan dalam kromatografi kolom.

6. Kromatotron

Kromatografi digunakan pada beberapa teknik pemisahan berdasarkan pada "*migration medium*" yang berbeda, yaitu distribusinya terhadap fase diam dan fase gerak. Terdapat 3 hal yang wajib ada pada teknik ini, yang pertama yaitu harus terdapat medium perpindahan tempat, yaitu tempat terjadinya pemisahan. Kedua harus terdapat gaya dorong agar spesies dapat berpisah sepanjang "*migration medium*". Ketiga harus terdapat gaya tolakan selektif. Gaya yang terakhir ini dapat menyebabkan pemisahan dari bahan kimia yang dipertimbangkan (Sienko *et al.*, 1984).

Kromatotron memiliki prinsip yang sama seperti kromatografi klasik dengan aliran fase gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal. Kromatografi jenis ini menggunakan rotor yang dimiringkan dan terdapat dalam ruang tertutup oleh plat kaca kuarsa, sedangkan lapisan penyerapnya berupa plat kaca yang dilapisi silika gel. Plat tersebut dipasang pada motor listrik dan diputar dengan kecepatan 800 rpm. Pelarut pengelusi dimasukkan kebagian tengah plat melalui semacam alat infus, sehingga dapat mengalir dan merambat melalui plat silika karena adanya gaya sentrifugal. Untuk mengetahui jalannya proses elusi, dimonitor dengan menggunakan lampu UV. Gas nitrogen dialirkan ke dalam ruang plat untuk mencegah pengembunan pelarut pengelusi dan mencegah oksidasi sampel. Pemasukan sampel diikuti dengan pengelusian menghasilkan pita-pita komponen berupa lingkaran sepusat. Pada tepi plat, pita-pita akan terputar keluar dengan gaya sentrifugal dan di tampung dalam botol fraksi, diidentifikasi dengan KLT (Hossettmann *et al.*, 1995).

2.4. Spektrofotometri

Spektrofotometer sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Kelebihan spektrometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat terseleksi dan ini diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating ataupun celahoptis. (Khopkar,2012)

Panjang gelombang yang digunakan adalah panjang gelombang optimum yakni panjang gelombang yang memberikan nilai absorbansi maksimum dan nilai transmitansi minimum. Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal dikarenakan pada panjang gelombang maksimal maka kepekaannya juga maksimal karena perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar. Di sekitar panjang gelombang maksimal, bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum Lambert Beer akan terpenuhi. Jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali, ketika digunakan panjang gelombang maksimum.

2.4.1. Prinsip Kerja Metode Spektrofotometri

Bila cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian diserap dalam medium itu, dan sisanya diteruskan. Jika intensitas sinar masuk dinyatakan oleh $I_0 = I_a + I_t + I_r$

Dimana : I_0 = intensitas sinar masuk

I_a = intensitas sinar terserap

I_t = intensitas sinar diteruskan

I_r = intensitas sinar terpantulkan

2.4.2. Jenis Spektrofotometri dan Mekanisme Kerja

1. Spektrofotometri Visible

Pada spektrofotometri ini yang digunakan sebagai energi adalah sinar cahaya tampak dengan λ 380-750 nm. Cara kerja dari spektrofotometri ini adalah sampel yang akan dianalisa harus memiliki warna. Oleh sebab itu, untuk sampel yang tidak berwarna harus terlebih dahulu diberi warna dengan reagen spesifik yang akan memberi warna pada senyawa.

2. Spektrofotometri UV

Spektrofotometri UV berdasarkan interaksi sampel dengan sinar UV yang memiliki λ 190-380 nm. Area sinar UV tidak bisa dideteksi oleh mata kita maka senyawa yang dapat menyerap sinar ini terkadang merupakan senyawa yang tidak memiliki warna, bening, dan transparan. Oleh sebab itu, maka sampel yang tidak berwarna tidak perlu dibuat berwarna dengan penambahan reagen tertentu. Namun perlu diingat

bahwa sampel yang keruh harus dibuat bening dulu dengan filtrasi atau centrifugasi.

3. Spektrofotometri UV/VIS

Merupakan gabungan antara spektrofotometri visual dan V karena menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda. Sehingga dapat digunakan baik untuk sampel berwarna maupun sampel tidak berwarna.

4. Spektrofotometri IR (Inframerah)

Cahaya inframerah terbagi menjadi inframerah dekat, pertengahan, dan jauh. Inframerah pada spektrofotometri adalah inframerah jauh dan inframerah pertengahan yang mempunyai panjang gelombang kira-kira 2,5-1000 μm . Umumnya pada spektrofotometri IR digunakan dalam analisa kualitatif, biasanya digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa terutama senyawa organik. Hasil analisa biasanya berupa signal kromatogram hubungan intensitas IR terhadap panjang gelombang.

2.4.2.1. Spektrofotometri 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:

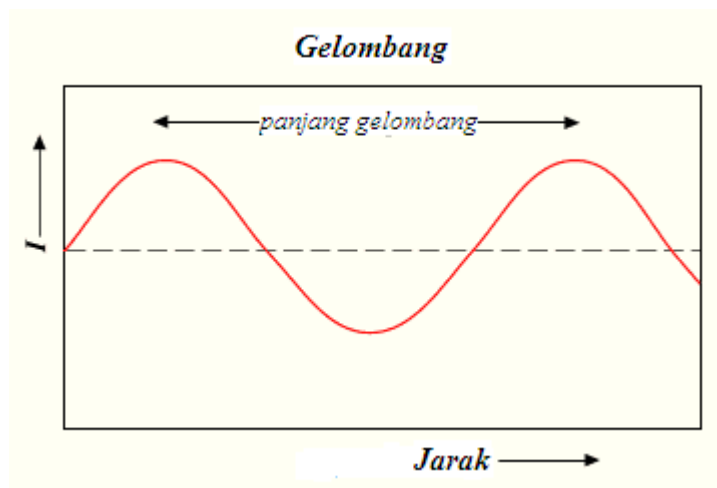
$$C = V \cdot \lambda$$

Dimana:

C = Kecepatan cahaya

V = Frekuensi dalam gelombang per detik (Hertz)

λ = Panjang gelombang dalam meter



Gambar 5. Radiasi Elektromagnetik dengan panjang gelombang λ
(Sumber: Setyawan Gadi, 2015)

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, 1981)

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. Sinar putih memiliki panjang gelombang mencakup 380-750 nm.

Panjang gelombang dari berbagai warna adalah sebagai berikut:

Tabel 5. Serapan Sinar dan Zat Warna

λ (nm)	Warna yang Diteruskan	Warna yang Diserap
400-435	Ungu	Hijau – Kekuningan
435-480	Biru	Kuning
480-490	Biru-Kehijauan	Jingga
490-500	Hijau-Kebiruan	Merah
500-560	Hijau	Ungu Kemerahan
560-580	Hijau-Kekuningan	Ungu
580-595	Kuning	Biru
595-610	Jingga	Biru Kehijauan
610-750	Merah	Hijau Kebiruan

(Sumber: Underwood, 2002)

2.4.2.2. 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 LambertBeer, maka diperoleh bahwa serapan berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan sel yang dapat ditulis dengan persamaan:

$$A = k.c.b$$

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:

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

Dimana:

A = serapan

a = absorptivitas

b = ketebalan sel

c = konsentrasi

ϵ = absorptivitas molar

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)

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)

2.4.2.3. 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.

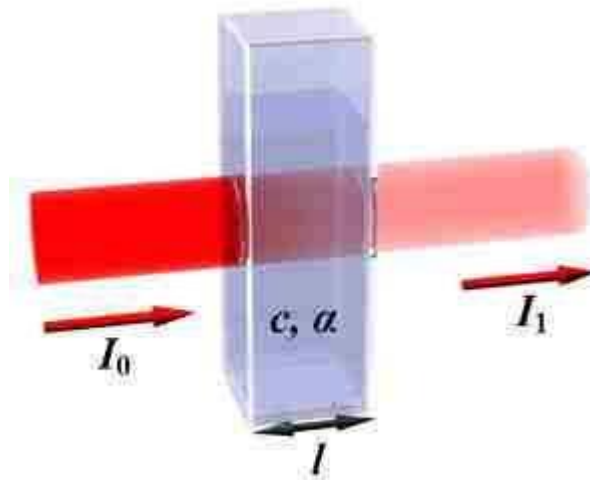
Jika zat menyerap cahaya tampak dan ultraviolet maka akan terjadi perpindahan elektron dari keadaan dasar menuju ke keadaan tereksitasi. Perpindahan elektron ini disebut transisi elektronik. Apabila cahaya yang diserap adalah cahaya inframerah maka elektron yang ada dalam atom atau elektron ikatan pada 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_0/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 6. Proses Penyerapan Cahaya
(Sumber: Setyawan Gadi, 2015)

Gambar Proses penyerapan cahaya oleh zat dalam sel sampel. dari gambar 2 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:

$$T = I_t/I_0 \text{ atau } \% T = (I_t/I_0) \times 100 \%$$

Dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = -\log I_t/I_0$$

Dimana :

I_0 merupakan intensitas cahaya datang

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, 2012)

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.

2.4.2.4. 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.

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 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).