

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Buah Bit (*Beta vulgaris L.*)

2.1.1. Pengertian Buah Bit

Bit merah (*Beta vulgaris L.*) merupakan tanaman berbunga dari famili *Chenopodiaceae*, yang memiliki bentuk morfologis seperti umbi dan umumnya dijadikan sebagai sayuran. Serta banyak dijumpai di Eropa dan sebagian Asia serta Amerika. Ciri khas dari bit merah adalah warna akar bit yang berwarna merah pekat, rasa yang manis seperti gula, serta aroma bit yang dikenal sebagai bau tanah (earthy taste).

(Widyaningrum dan Suhartiningsih, 2014)

Aplikasi buah bit yang sudah ada dalam industri pangan mencakup ekstrak tanaman bit sebagai pewarna alami merah keunguan. Senyawa betalain pada bit berbeda dengan pigmen antosianin pada tanaman lain karena pigmen ini juga mengandung senyawa nitrogen yang memiliki efek positif terhadap aktivitas radikal bebas dan kanker sehingga akar bit juga mulai dikembangkan sebagai alternatif pewarnaan pada produk sosis (Winanti, dkk., 2013). Pigmen merah pada buah bit merupakan senyawa bernitrogen yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi dan bersifat larut air, akan tetapi senyawa ini rentan mengalami degradasi akibat pengaruh suhu, pH, cahaya, dan oksigen.

2.1.2. Klasifikasi Buah Bit

Dalam taksonomi tumbuhan, *Beta vulgaris L* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*
 Sub Kingdom : *Tracheobionta*
 Super Divisi : *Spermatophyta*
 Divisi : *Magnoliophyta*
 Kelas : *Magnoliopsida*
 Sub Kelas : *Hamamelidae*
 Ordo : *Caryophyllales*
 Famili : *Chenopodiaceae*
 Genus : *Beta*
 Spesies : *Beta vulgaris L.*



Gambar 1. Buah Bit

(Splittstoesser, 1984)

2.1.3. Kandungan Nutrisi Buah Bit Merah

Bit merah mengandung pigmen betalain pembentuk warna merah keunguan yang berperan sebagai antioksidan sehingga berpotensi sebagai pangan fungsional. Senyawa betalain pada bit berbeda dengan pigmen antosianin pada tanaman lain karena pigmen ini juga mengandung senyawa nitrogen yang memiliki efek positif terhadap aktivitas radikal bebas dan kanker. Kandungan gizi utama bit merah adalah asam folat, serat dan gula, namun nilai kalori bit merah masih tergolong sedang.

Tabel 1. Komposisi gizi pada bit merah per 100 g bahan

Komposisi	Jumlah
Air (g)	87,58
Energi (kkal)	43,00
Protein (g)	1,68
Lemak (g)	0,18
Abu (g)	1,10
Karbohidrat (g)	9,96
Serat pangan (g)	2,00
Gula (g)	7,96
Kalsium (mg)	16,00
Besi (mg)	0,79
Magnesium (mg)	23,0
Fosfor (mg)	38,0
Sodium (mg)	77,0
Kalium (mg)	305,0
Zinc (mg)	0,35
Cuprum (mg)	0,075
Mangan (mg)	0,329
Selenium (μg)	0,7
Vitamin C (mg)	3,6
Thiamin (mg)	0,031
Riboflavin (mg)	0,027
Niasin (mg)	0,331
Asam Pantotenat (mg)	0,145
Vitamin B-6 (mg)	0,067
Folat (μg)	80,0
Betalain (mg)	128,7
Beta karoten (μg)	20,0
Vitamin A (IU)	33,0
Vitamin E (μg)	0,04
Vitamin K (μg)	0,20

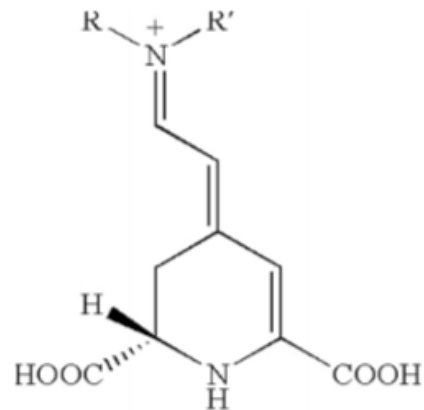
(United State Department of Agricultural, 2013)

Buah bit juga bermanfaat untuk mencegah penyakit stroke, menurunkan kolesterol, mencegah penyakit jantung, memperkuat daya tahan tubuh, mengeluarkan racun dari dalam tubuh mengobati infeksi dan radang, sebagai penghasil energi bagi tubuh serta meningkatkan system kekebalan tubuh. Buah bit merupakan salah satu buah yang memiliki kandungan nutrisi yang komplit dan sangat baik untuk dikonsumsi secara rutin.

2.2. Betalain

Pigmen betalain dalam bit merah tersusun oleh dua senyawa pigmen yaitu betasianin berwarna ungu kemerahan dan betaxanthin berwarna kekuningan. Betalain bersifat larut air, kaya akan nitrogen dan menghasilkan warna kemerahan sehingga potensial dijadikan sebagai pewarna alami dalam produk pangan. Pigmen betalain dapat dijadikan sebagai alternatif pewarna antosianin yang terkandung pada jenis buah lain karena stabilitas dan resistensi betalain terhadap pengaruh pH dan suhu lebih baik terutama pada pH asam rendah. Senyawa betalain memiliki sifat fungsional sebagai antimikroba dan antioksidan yang mampu menghambat perkembangan sel-sel tumor pada tubuh manusia (Slavov, dkk., 2013).

Kestabilan pigmen pada bit merah yang berperan sebagai komponen bioaktif dipengaruhi oleh nilai pH. Pigmen di dalam bit merah lebih stabil pada kondisi asam rendah, yaitu pH 4,5. Penurunan pH akan menyebabkan perubahan pigmen merah menjadi warna ungu, sedangkan kenaikan pH menyebabkan perubahan menjadi kuning kecokelatan.

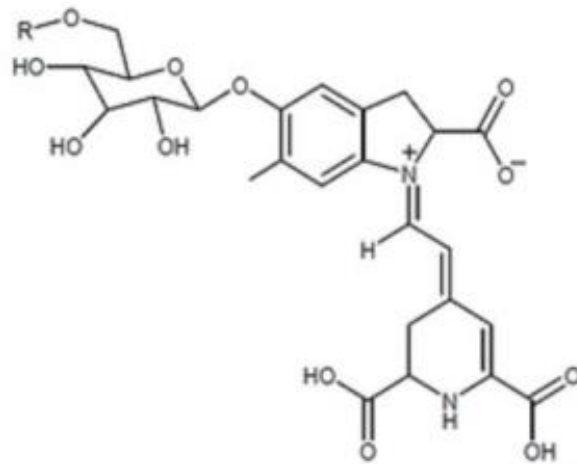


Gambar 2. Struktur Kimia Senyawa Betalain

2.2.1 Betasianin

Coultate (1996) menyatakan bahwa betalain dibagi menjadi dua kelompok yaitu betasianin dengan warna pigmen merah keunguan (λ_{\max} 534-555 nm) dan betaxantin dengan warna pigmen kuning (λ_{\max} 480 nm). Betasianin adalah zat warna yang berfungsi memberikan warna merah dan berpotensi menjadi pewarna alami untuk bahan pangan yang lebih aman bagi kesehatan dibanding pewarna sintetik. Betasianin dapat digunakan sebagai pewarna alami dalam bentuk ekstrak, akan tetapi penggunaan pelarut air dalam proses pemekatan dengan panas dapat mengakibatkan kerusakan karena titik didih air cukup tinggi (100°C) sedangkan stabilitas betasianin semakin menurun pada pemanasan suhu 70 dan 80°C (Havlikova et al., 1983).

Betasianin sangat sensitif terhadap beberapa faktor. Adapun faktor yang mempengaruhi kestabilan senyawa betasianin, yaitu suhu, pH, cahaya, dan oksigen (Herbach, et.al., 2006).



Gambar 3. Struktur Kimia Senyawa Betasianin

2.3. Teknik Isolasi Betasianin

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 kedalam ruang plat untuk mencegah pengembunan pelarut pengelusi dan mencegah oksidasi sampel. Pemasukan sampel diikuti dengan pengelusan menghasilkan pita-pita komponen berupa lingkaran sepusat. Pada tepi plat, pita-pita akan berputar keluar dengan gaya sentrifugal dan ditampung 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 pengukurintensitas 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 celah optis. (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 sentrifugasi.

3. Spektrofotometri UV/VIS

Merupakan gabungan antara spektrofotometri visual dan UV 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.

2.4.3 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:

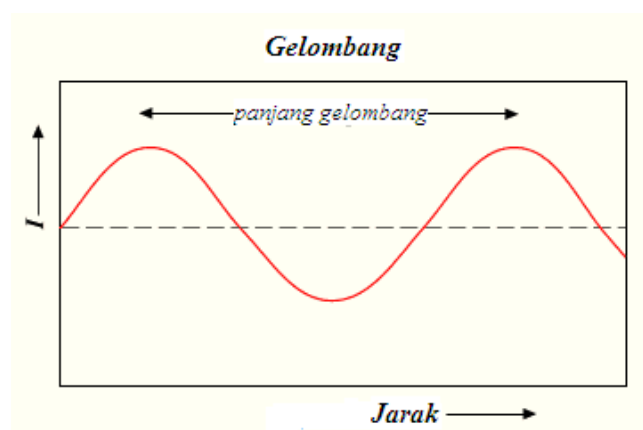
$$C = V \cdot \lambda$$

Dimana:

C = Kecepatan cahaya

V = Frekuensi dalam gelombang per detik (Hertz)

λ = Panjang gelombang dalam meter



Gambar 4. Radiasi Elektromagnetik dengan panjang gelombang λ (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 2. 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

(Underwood, 2002)

2.4.4 Hukum Lambert – Beer

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

$$A = k \cdot b$$

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

$$A = k \cdot C$$

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

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

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

Jadi dalam sistem dikombinasikan, hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dalam rumus berikut:

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

Dimana:

A = serapan

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)

2.4.5 Proses Absorpsi Cahaya pada Spektrofotometri

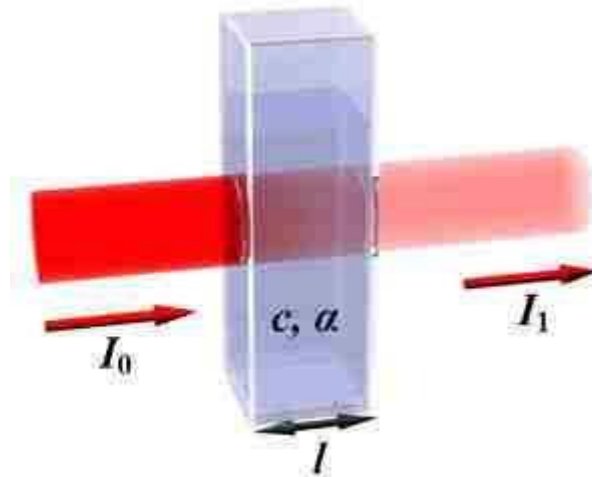
Ketika cahaya dengan panjang berbagai panjang gelombang (cahaya polikromatis) mengenai suatu zat, maka cahaya dengan panjang gelombang tertentu saja yang akan diserap. Di dalam suatu

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 5. Proses Penyerapan Cahaya
(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_1 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.

2.4.6 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).