

---

# PENGUKURAN SPEKTRUM KLOOROFIL DAUN SUJI MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER SEDERHANA

Etti Hartiwi<sup>1</sup> dan Suryasatriya Trihandaru<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Magister Biologi Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga

<sup>2</sup>Program Studi Fisika Universitas Kristen Satyawacana, Salatiga

<sup>1</sup>E-mail: etti\_hartiwi@yahoo.com

**Abstrak.** Klorofil merupakan zat hijau daun yang berperan dalam proses fotosintesis. Klorofil banyak ditemukan pada tumbuhan terutama bagian daun. Daun suji (*Pleomele angustifolia*) digunakan oleh masyarakat sebagai pewarna makanan alami yang mengandung klorofil. Pengukuran spektrum klorofil dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Namun, pengadaan spektrofotometer modern bukanlah hal yang mudah dan mengingat harga alat ini relatif mahal. Pengenalan prinsip spektroskopi pada tingkat sekolah sangat terbatas. Spektrofotometer sederhana dapat digunakan sebagai bahan ajar di sekolah. Dalam kondisi yang terbatas, jauh dari laboratorium modern, kita tetap dapat menganalisa sifat suatu bahan dengan menggunakan spektrofotometer sederhana dengan memanfaatkan CD bekas, palaron, dan *webcam*.

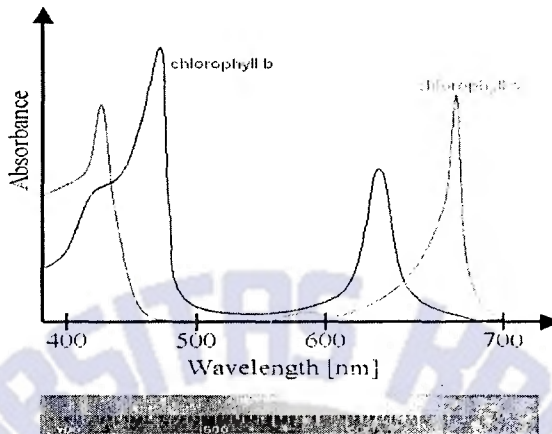
**Kata kunci:** klorofil, daun suji, spektrofotometer sederhana.

## 1. Pendahuluan

Klorofil merupakan zat warna hijau pada daun. Dengan adanya klorofil pada daun, tumbuhan yang memiliki daun hijau dapat menghasilkan makanan melalui proses fotosintesis. Klorofil merupakan zat yang sensitif terhadap cahaya, terutama sinar dengan warna ungu atau biru dan jingga atau merah. Pada daun, ada dua jenis klorofil, yaitu klorofil *a* yang mengandung warna dominan hijau dengan susunan kimia  $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$  dan klorofil *b* yang didominasi warna biru dengan susunan kimia  $C_{55}H_{70}MgN_4O_6$ . Klorofil-klorofil ini disimpan dalam organel-organel penyimpan klorofil, yaitu kloroplas.

Warna hijau klorofil disebabkan karena tidak efektif dalam menyerap cahaya gelombang hijau dan hanya memantulkan saja. Klorofil menunjukkan serapan maksimum di daerah biru (400-450 nm) dan merah (650-700 nm) dari spektrum tampak [4] (lihat Gambar 1). Klorofil sangat sedikit menyerap cahaya di daerah spektral antara 500-600 nm. Cahaya tersebut merupakan cahaya di daerah hijau yang jika direfleksikan ke mata manusia akan menimbulkan sensasi warna hijau. Dengan kata lain, ketika cahaya putih polikromatik menyinari klorofil daun, cahaya hijau tersebut ditransmisikan dan direfleksikan sehingga klorofil tampak berwarna

hijau. Spektra serapan klorofil *a* berbeda dengan spektra serapan klorofil *b*. Perbedaan tersebut disebabkan adanya perbedaan struktur antara keduanya.



Gambar 1: Spektrum klorofil a dan b.



Gambar 2: Tanaman suji sebagai pewarna makanan berklorofil.

Daun Suji merupakan tumbuhan perdu tahunan yang daunnya dimanfaatkan orang sebagai pewarna hijau alami untuk makanan (lihat Gambar 2). Daun suji memberi warna hijau yang lebih pekat daripada daun pandan wangi, yang juga merupakan sumber warna hijau tetapi tidak memiliki aroma.

Selain dimanfaatkan sebagai pewarna, tumbuhannya biasa ditanam di pekarangan karena bentuknya yang indah dan bunganya yang menyebarkan aroma wangi, terutama pada sore hari. Bunga majemuk tersusun dalam karangan dengan mahkota bunga berwarna putih kekuningan, kadang-kadang dengan semburat ungu.

Spektroskop adalah alat untuk mengurai cahaya yang sangat erat kaitannya dengan sifat fisis sumber cahaya tersebut. Radiasi elektromagnetik dapat digunakan untuk menyelidiki sifat dari suatu zat serta mengetahui jumlah zat pada sampel. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan atom atau molekul, mengganggu elektron pada orbit dari atom atau molekul tersebut. Perhitungan secara kuantitatif dari perubahan radiasi elektromagnetik dengan menggunakan instrumentasi optik merupakan dasar spektroskopi.

Seperti lazimnya metode atau teknik pengukuran, proses perhitungan akan melibatkan serentetan kejadian terpadu. Pertama, zat yang akan diukur diidentifikasi (berupa atom atau molekul), kemudian dibuat interaksi antara radiasi elektromagnetik pada suatu panjang gelombang dengan jenis zat tersebut. Informasi dari zat kemudian ditransmisikan ke fotodetektor yang bertindak sebagai transduser yang mengubah besaran tersebut menjadi besaran listrik agar mudah diidentifikasi. Dengan kata lain, secara kuantitatif energi yang diserap oleh zat akan identik dengan jumlah zat per kandungan zat tersebut, sedangkan secara kualitatif panjang gelombang dimana energi dapat diserap akan menunjukkan jenis zatnya.

Semua jenis spektrofotometer merupakan alat ukur 'optikelektronik' yang fungsi kerjanya merupakan gabungan dari dua bidang ilmu yaitu optik dan elektronik. Pada dasarnya spektrofotometer tersusun dari beberapa bagian yaitu sumber cahaya, monokromator, tempat sampel, detektor atau sensor cahaya, dan sistem pembacaan/komponen elektronik pemroses data.

Umumnya spektroskopi dengan sinar UV dan sinar tampak (Vis) dibahas bersama karena sering kedua pengukuran dilakukan pada waktu yang sama. Karena spektroskopi UV-Vis berkaitan dengan proses berenergi tinggi yakni transisi elektron dalam molekul, informasi yang didapat cenderung untuk molekul keseluruhan bukan bagian-bagian molekulnya. Metode ini sangat sensitif dan dengan demikian sangat cocok untuk tujuan analisis. Lebih lanjut, spektroskopi UV-Vis sangat kuantitatif dan jumlah sinar yang diserap oleh sampel diberikan oleh Hukum Lambert-Beer.

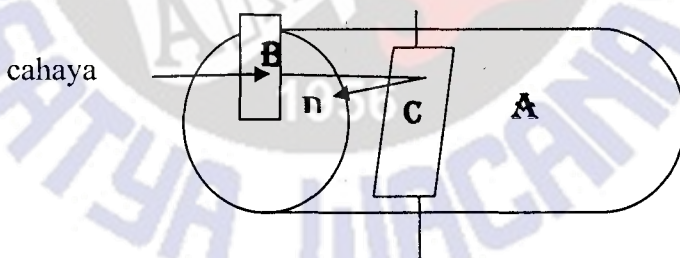
Pengenalan prinsip spektroskopi di tingkat sekolah masih sangat kurang. Hal ini disebabkan oleh keterbatasan alat yang tersedia. Harga satu unit spektrofotometer sangat mahal dan perlu pengoperasian serta pemeliharaan khusus. Dalam tulisan ini akan dibahas tentang bagaimana memperkenalkan metode sederhana dengan memanfaatkan bahan dari CD bekas, paralon dan webcam. Prinsip spektrofotometer sederhana sama dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu dengan mendifraksi cahaya yang masuk melalui CD. Pada dasarnya CD merupakan sebuah kisi dengan resolusi 625 baris/mm. Seperti fungsi kisi yang mendifraksi cahaya, CD pun dapat dipergunakan mendifraksi cahaya. Adanya kisi itulah yang membuat kita melihat warna pelangi pada CD.

Mahalnya alat spektroskopi UV-Vis ini mengakibatkan kurang diminatinya pengukuran spektrum warna untuk diterapkan di sekolah. Untuk mengantisipasi hal tersebut, dibuat sebuah alat spektrofotometer sederhana. Bentuk alat tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3: Spektrofotometer sederhana.

Prinsip kerja alat ini adalah dengan memanfaatkan spektrum warna pelangi yang dapat dibiaskan oleh CD bekas di dalam pipa pralon. Kemudian *software* untuk pengolahan datanya dibuat dengan menggunakan program Matlab. Sketsa alat spektroskopi sederhana tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4: Sketsa alat spektroskopi sederhana. A adalah pipa pralon berwarna gelap, B lubang tempat meletakkan sampel dan cahaya yang masuk, C adalah potongan CD bekas, D adalah webcam.

Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk melihat perbandingan spektrum klorofil dari daun suji yang dihasilkan oleh UV-Vis Varian Carry 50 dengan alat spektrofotometer sederhana.

## 2. Alat, Bahan, dan Metode

### 2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah mortar, gelas ukur, corong pisah, statif, erlenmeyer, spektrofotometer UV-Vis Varian Carry 50, kuvet, botol vial, spektrofotometer sederhana.

Sampel yang digunakan adalah daun suji yang didapat dari pekarangan rumah. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah aseton, metanol, heksana, dietil eter, akuades, gas N<sub>2</sub>. Bahan membuat spektrofotometer sederhana meliputi CD dan paralon.

### 2.2 Metode Penelitian

#### Ekstraksi daun suji

5 gram sampel diekstrak dengan aseton: methanol 3 : 7 (v/v) dengan perbandingan sampel: pelarut adalah 1:10 (w/v). Pada waktu ekstraksi ditambahkan CaCO<sub>3</sub> sebagai agen penetral dan asam L-askorbat sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya oksidasi. Ekstrak pigmen yang diperoleh disaring dan residunya diekstrak kembali hingga semua pigmen terangkat. Ekstrak pigmen ditambah dengan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat, selanjutnya dipartisi dengan pelarut eter. Pigmen yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dikeringkan dengan gas N<sub>2</sub>. [1]

#### Spektrofotometer UV-Vis

Pigmen dilarutkan dalam aseton kemudian dibuat beberapa seri pengenceran dan pola spektranya dianalisa dengan spektrofotometer Varian Carry 50 pada panjang gelombang 350 – 800 nm. Pola spektrum pigmen dibandingkan dengan pola spektrum pigmen standar dan literatur, serta didapatkan panjang gelombang maksimum dari tiap-tiap pigmen.

#### Spektrofotometer sederhana

Pigmen dilarutkan dalam aseton kemudian dibuat beberapa seri pengenceran dan pola spektrumnya dianalisa dengan spektrofotometer sederhana. Pola spektra pigmen dibandingkan dengan pola spektra pigmen hasil pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis.

## 3. Hasil dan Bahasan

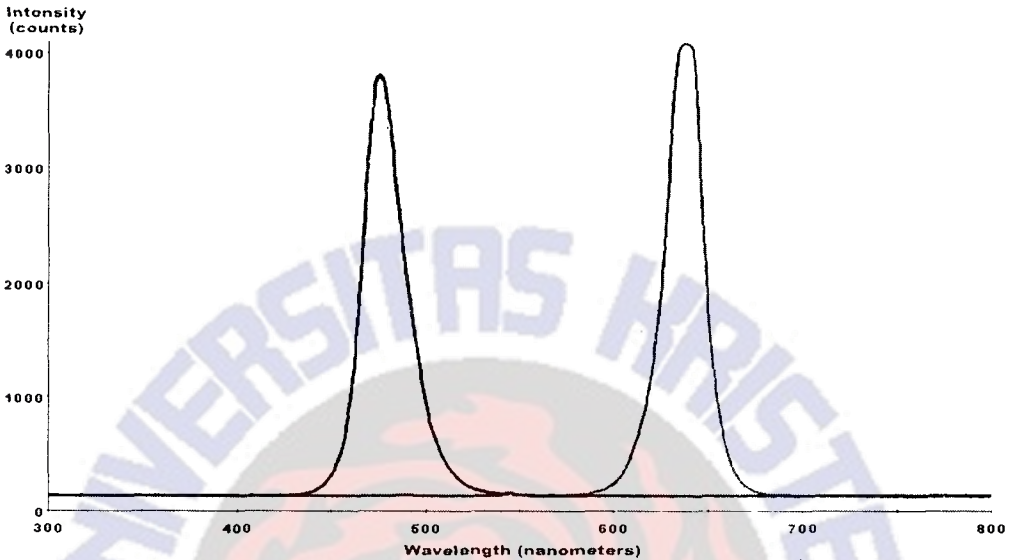
Dalam percobaan ini dilakukan ekstraksi pigmen klorofil dari daun suji dengan menggunakan pelarut aseton dan metanol. Kemudian diukur serapan pigmen dengan spektrofotometer sederhana dibandingkan serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 350-800 nm.

Ide dasar dari spektrofotometer sederhana adalah meletakkan CD yang telah dipotong menjadi seperdelapan bagian ke dalam sebuah kotak atau paralon yang diberi lubang cahaya dan lubang intip. Spektrofotometer sederhana ini bekerja dengan memanfaatkan spektrum warna pelangi dari potongan CD bekas untuk memecah cahaya. Pada dasarnya CD merupakan sebuah kisi dengan resolusi 625 baris/mm dan bersifat reflektor. Sehingga CD mampu mendifraksi cahaya, dan kita dapat melihat warna pelangi yang dipantulkan oleh CD. CD tersebut dimasukkan ke dalam kotak berwarna hitam. Hal ini dimaksudkan untuk mengurangi atau menghilangkan efek cermin (pantulan) pada CD. Lubang cahaya dimaksudkan untuk tempat masuknya sumber cahaya. Gelombang cahaya dimasukkan ke CD akan mengalami peristiwa penyimpangan cahaya atau difraksi kisi-kisi CD dan akan membentuk pola gelap terang. Ketika gelombang cahaya menjalar melewati larutan (ekstrak) maka intensitas yang dihasilkan akan lebih kecil dibandingkan dengan intensitas semula. Hal ini terjadi karena elektron dari larutan tersebut bergerak dan menyerap cahaya yang lewat.

Kemudian pengambilan sampel diolah dengan program Matlab. Matlab mengolah data dari panjang gelombang yang ditangkap oleh *webcam*, sehingga didapat hasil berupa data absorbansi blanko (pelarut) dan ekstrak dalam pelarut. Proses penghitungan data yang diperoleh adalah dengan mengukur terlebih dahulu blanko yang digunakan. Blanko yang digunakan pada penelitian ini adalah aseton. Setelah pengukuran blanko selesai dilanjutkan dengan pengukuran sampel. Penggunaan analisis blanko pada awal pengukuran bertujuan untuk mengetahui serapan murni ekstrak pigmen daun suji, karena tentu saja spektrofotometer sederhana ini belum dapat mengukur spektra pigmen dan pelarutnya secara otomatis. Hasil pengukuran sampel kemudian dikurangi dengan hasil pengukuran blanko. Dari data tersebut kemudian dibuat grafiknya terhadap panjang gelombang. Panjang gelombang yang digunakan diperoleh dari persamaan linear  $\lambda = ax + b$ , dimana  $\lambda_1$  dan  $\lambda_2$  adalah panjang gelombang LED (*Light Emitting Diode*) kuning dan merah. Dengan memasukkan nilai panjang gelombang LED kuning adalah 588 nm dan LED merah adalah 660 nm, diperoleh nilai  $a$  sebesar  $\frac{4}{3}$  dan nilai  $b$  sebesar 344. Dari persamaan  $\lambda = \frac{4}{3}x + 344$  diperoleh panjang gelombang berkisar antara 345–742 nm.

Semua warna dapat dihasilkan oleh CD sehingga dapat berfungsi sebagai reflektor cahaya. Pada spektrofotometer sederhana digunakan lampu pijar yang bersifat monokromatik yang dipantulkan ke CD sehingga dihasilkan warna. Cahaya dari sumber diteruskan melalui lubang kecil yang terdapat pada paralon. Ketika cahaya masuk sampai ke CD akan terlihat dari *webcam* yang dihubungkan ke laptop dan akan terlihat bentuk spektrum cahaya (monokromatik) yang dapat digrafikkan. Kalibrasi alat dengan LED perlu dilakukan karena cahaya yang dihasilkan oleh letak sudut CD mempengaruhi letak cahaya merah dan kuning.

Dalam percobaan ini digunakan acuan LED merah dan kuning. Dari literatur (lihat Gambar 5) menunjukkan panjang gelombang LED merah antara 400-700 nm sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam mengukur spektrum korofil.

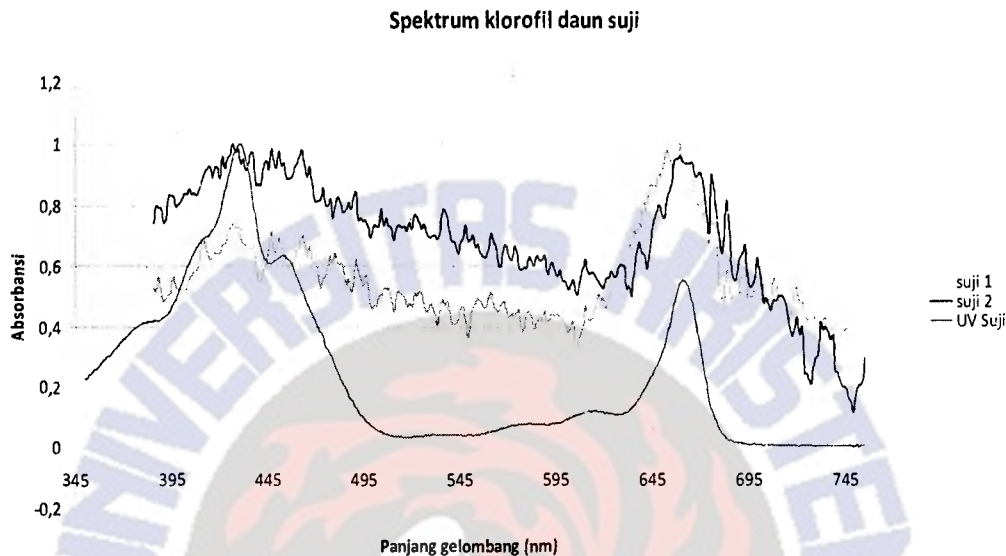


**Gambar 5:** Spektrum pada LED biru, kuning, dan merah.

Dengan spektrofotometer sederhana dapat dilakukan pengukuran spektrum pigmen. Klorofil merupakan salah satu pigmen yang dapat diperoleh dengan mengekstrak bagian tanaman terutama bagian daun. Daun suji merupakan salah satu sampel yang dapat digunakan sebagai sampel dalam percobaan ini. Sampel daun suji ini mudah diperoleh karena biasanya masyarakat menanamnya di pekarangan rumah sebagai tanaman hias sekaligus bermanfaat sebagai pewarna alami makanan. Daun suji memiliki tingkat kepekatan warna hijau sangat tinggi yang berarti banyak mengandung klorofil. Sehingga pemilihan sampel daun suji diharapkan dapat merepresentasikan pengenalan serapan klorofil pada panjang gelombang tertentu.

Satu spektrum UV-Vis didapatkan dengan mengukur cahaya yang diserapkan oleh satu sampel sebagai fungsi jarak gelombang. Karena hanya paket diskret tenaga (jarak gelombang tertentu) yang diserap oleh molekul di dalam sampel itu, secara teorinya spektrum yang dihasilkan seharusnya mengandung garis diskret yang tajam. Namun demikian, karena banyaknya aras getaran setiap aras tenaga elektron dapat menambah kemungkinan bilangan transisi. Sebagai hasilnya ialah beberapa garis spektra yang secara bersama membentuk spektrum puncak yang lebar. Spektrum penyerapan digunakan untuk mengenal molekul karena pada panjang gelombang tertentu penyerapannya tergantung pada kehadiran kumpulan atau susunan atom di dalam sampel itu.

Dari hasil spektrum klorofil menggunakan spektrofotometer UV-Vis, ditunjukkan dominasi spektrum klorofil yang ditandai dengan keberadaan puncak-puncak klorofil pada daerah sorot 429 nm, daerah  $Q_x$  578 nm, sedangkan daerah  $Q_y$  661 nm. Berdasarkan pola spektrum daun suji memiliki jenis pigmen klorofil  $a$ , hal ini sesuai dengan serapannya pada panjang gelombang 430, 580, dan 662 nm [5].



**Gambar 6:** Pola spektrum klorofil daun suji dengan spektrofotometer sederhana dan UV-Vis.

Perbandingan pola spektra dengan spektrofotometer sederhana dan UV-Vis ditunjukkan pada Gambar 6. Dalam percobaan ini dilakukan pengenceran dan secara signifikan tidak mengubah pola spektrum. Pola spektra hasil pengukuran dengan spektrofotometer sederhana memiliki puncak hampir mirip dengan spektra UV-Vis. Pola spektra yang dihasilkan dari spektrofotometer sederhana nampak kurang 'halus', kemungkinan hal ini disebabkan oleh konsentrasi sampel yang hampir sama dengan blangko sehingga absorpsinya kecil. Faktor lain yang mempengaruhi pola spektra yang dihasilkan adalah penggunaan *webcam* dalam menangkap cahaya yang dihasilkan oleh CD. *Webcam* lebih sensitif pada cahaya merah dibandingkan cahaya biru. Bentuk spektra yang berbeda-beda lebih cenderung dipengaruhi oleh CD atau LED yang bergeser. Pengukuran dengan sudut CD mempengaruhi letak panjang gelombang berubah-ubah, sehingga perlu dikalibrasi dengan LED sebagai acuan.

Penggunaan spektrofotometer sederhana untuk pengenalan atau memberi gambaran mengenai bentuk spektra pada ekstrak pigmen sudah dapat mewakili spektrofotometer UV-Vis. Tentu saja jika dibandingkan dengan UV-Vis, spektrofotometer sederhana memiliki banyak kekurangan. Keakuratan data yang



dihasilkan tidak sebaik dengan spektroskopi UV-Vis. Kemampuan LED monokromatik yang digunakan juga tidak sebaik sensor cahaya pada UV-Vis.

#### 4. Kesimpulan dan Saran

Diperoleh beberapa kesimpulan seperti berikut:

- Spektrum klorofil pada daun suji dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer sederhana.
- Spektrum klorofil a yang dihasilkan oleh spektroskopi UV-Vis terdiri dari 3 puncak pada daerah solet 429 nm, daerah  $Q_x$  578 nm, sedangkan daerah  $Q_y$  661 nm.
- Spektrum klorofil yang dihasilkan oleh spektrofotometer sederhana mirip dengan spektrofotometer UV-Vis.
- Sensitifitas spektrofotometer UV-Vis berbeda dengan spektrofotometer sederhana.
- Spektrofotometer sederhana dapat digunakan sebagai bahan ajar pada tingkat sekolah untuk memperkenalkan prinsip spektroskopi.

Berikut ini adalah beberapa saran dari penulis:

- Perlu riset lebih lanjut untuk lebih mengembangkan spektroskopi sederhana ini, agar tingkat keakuratannya bisa lebih ditingkatkan.
- *Webcam* perlu diganti dengan kamera yang lebih bagus sehingga hasilnya juga akan lebih baik.

#### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Depdiknas RI atas Beasiswa Unggulan yang diberikan melalui program Beasiswa Unggulan (BU) pada Program Studi Magister Biologi, UKSW.

#### Daftar Pustaka

- [1] Britton, G., S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, *Carotenoids: Isolation and Analysis*, Birkhauser Verlag Basel, Berlin.
- [2] Cav, G. H., E. Sofic, R. L. Prior, 1996, Antioxidant Capacity of Tea And Common Vegetables, *J. Agric. Food Chem.* **44**; 11:3426-3431.
- [3] Gitelson, A., Y. A. Grits, D. Etzion, Z. Ning, 2000, Optical Properties of *Nannochloropsis sp.* and Their Application to Remote Estimation of Cell Mass, *Biotechnol. Bioeng* **69**; 5:516–525.
- [4] Gross, J., 1991, *Pigment in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*, Van Nostrand Reinhold, New York.

- [5] Jeffrey, S. W. & G. F. Hamphrey, 1975, New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae, and Natural Phytoplankton, *Biochem. Physiol. Pflanzen*; 167:191-194.
- [6] Limantara, L. et al., 2006, Photostability of Bacteriochlorophyll a and Derivatives: Potential Sensitizer for Photodynamic Tumor Therapy, *Photochemistry and Photobiology*; 82:770-780.
- [7] Pepe, M., C. Giordino, G. Borsani, A. C. Cardoso, G. Chiauda, E. G. Premazzi, Rodari, E. Zilioli, 2001, Relationship between Apparent Optical Properties and Photosynthetic Pigments in The Sub-alpine Lake Iseo, *Science of Total Environment*; 268:31-45.
- [8] Porra, R. J., W. A. Thompson, P. E. Kriedemann, 1989, Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations for Assaying Chlorophylls a and b Extracted with Four Different Solvents: Verification of The Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic Absorption Spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*. 975; 384-394.
- [9] Porra, R. J., 1991, *Recent Advances and Re-assessment in Chlorophyll Extraction and Assay Procedures for Terrestrial, Aquatic, and Marine Organism, Including Recalcitrant Algae*, CRC Press. London.
- [10] Rahmayanti, E. & M. Sitanggang, 2006, *Taklukkan Penyakit dengan Klorofil Alfalfa*, PT Agro Media Pustaka, Jakarta.
- [11] Rao, P. dan R. V. Sudershan, 2008, Risk assessment of synthetic food colours: a case study in Hyderabad, India, *Int. J. Food Safety, Nutrition and Public Health* 1; 1:68-87.
- [12] Sandnes, J. M., 2005, *Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors*. Norwegian Institute for Water Research (NIVA), P.B. 173, Kjelsås, 0411 Oslo, Norway.
- [13] Sudarmadji, S., B. Haryono, Suhardi, 1997, *Prosedur Analitik Untuk Bahan Makanan Dan Pertanian*, Liberty, Yogyakarta.
- [14] Tagashira & Ohtake dalam Panuvska, Kulevanova, Svetlana, Stefova, Marina, 2005, In Vitro Antioxidant Activity of Some Teucrium species (*Laminaceae*), *Acta Pharm.*; 55:207-214.