

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Dewasa ini perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi semakin pesat, hal ini ikut mendorong perkembangan ilmu kimia analisis. Terutama dalam hal metode analisis instrumental, dimana metode modern dengan peralatan canggih dapat digunakan sebagai metode alternatif pengganti metode konvensional. Dengan adanya kemajuan tersebut, suatu analisis yang membutuhkan waktu lama dan kurang praktis serta efisien dapat diselesaikan dalam waktu relatif singkat dengan hasil memuaskan serta menjamin keamanan penggunaannya. Pemilihan metode merupakan masalah yang terpenting di dalam setiap analisis, karena metode yang akan dipilih itu merupakan pencerminan dari beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut antara lain: tujuan analisis, macam bahan, jumlah bahan yang dianalisis, ketepatan dan ketelitian yang diinginkan, lamanya waktu yang diperlukan untuk analisis, serta peralatan yang tersedia (Fatah dan Mursyidi, 1982).

Untuk mengetahui apakah suatu sediaan memenuhi syarat atau tidak, diperlukan pemeriksaan mutu dari sediaan tersebut, dan salah satu cara pemeriksaan mutu adalah dengan menetapkan kadar sediaan tersebut secara analisis kuantitatif. Dalam menentukan jumlah (kadar) suatu senyawa tertentu seringkali dapat dilakukan dengan berbagai macam metode. Dalam hal demikian, tugas kimia analisis kuantitatif bukan sekedar melakukan penetapan kadar sesuai

dengan prosedur yang ada, tetapi lebih jauh harus dapat menentukan pilihan mana metode yang paling baik dan sesuai.

Dalam rangka pengembangan metode analisis serta pemilihan metode yang sesuai, maka penelitian menyangkut penggunaan serta perbandingan metode-metode tertentu untuk mengetahui perbedaan yang terdapat antara metode satu dengan lainnya masih diperlukan. Metode analisis yang dipilih dituntut memberikan ketelitian, ketepatan, selektifitas dan kecepatan tinggi. Kriteria utama yang perlu diperhatikan dalam suatu analisis adalah ketepatan, ketelitian dan selektifitas (Fatah dan Mursyidi, 1982).

Teobromin atau disebut juga 3,7 dimetil ksantin merupakan obat yang menimbulkan efek stimulasi ringan seperti stimulasi pernafasan, perlemasan otot polos bronkus pada asma bronkus dan pada kombinasi dengan ergot dapat meredakan sakit kepala migrain (Nieforth dan Cohen, 1981). Teofilin ($pK_a = 8,8$) dan teobromin ($pK_a = 10,0$). Teobromin dapat diperoleh melalui ekstraksi kulit buah coklat (Siswandono dan Bambang S., 2000).

Menurut *The United State Pharmacopeia* teobromin ditetapkan menggunakan titrasi bebas air (Anonim^b, 1995). Metode titrasi bebas air merupakan metode konvensional, dimana metode konvensional memerlukan sampel yang lebih banyak serta membutuhkan waktu yang relatif lama dibandingkan dengan metode yang lebih modern.

Banyak senyawa yang tidak memiliki serapan sinar pada daerah tampak akan dapat bereaksi secara kuantitatif dengan reagen lain sehingga membentuk senyawa berwarna. Sifat inilah yang dipakai sebagai dasar penentuan analisis

senyawa tadi. Warna yang terbentuk diukur serapannya, maka dapat ditentukan kadarnya (Sudarmadji, dkk., 1996).

Teobromin akan bereaksi dengan kupri sulfat dalam suasana alkalis menghasilkan Cu_2O , yang akan mereduksi garam *fosfomolibdate fosfotungstat* dalam reagen Folin-Ciocalteu membentuk warna biru. Intensitas warna tersebut dapat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer visibel. Folin-Ciocalteu test juga disebut metode Lowry. Metode ini dapat mengukur kandungan protein cuplikan hingga 5 μl (Tranggono dan Setiaji, 1989).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka digunakan metode spektrofotometri sinar tampak dengan pereaksi Folin – Ciocalteu untuk menetapkan kadar teobromin. Dimana teobromin dengan Folin-Ciocalteu membentuk senyawa kompleks yang berwarna biru. Kompleks warna tersebut dapat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri sinar tampak.

B. Perumusan Masalah

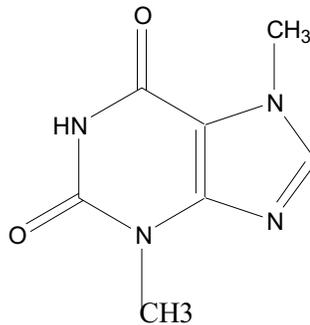
Perumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Apakah senyawa berwarna hasil reaksi antara teobromin dan pereaksi Folin-Ciocalteu dapat digunakan untuk menetapkan kadar teobromin secara spektrofotometri sinar tampak?
2. Apakah metode penetapan kadar teobromin secara spektrofotometri sinar tampak menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu dapat memenuhi ketepatan, ketelitian dan kepraktisan yang sama dengan metode titrasi bebas air?

C. Tinjauan Pustaka

1). Teobromin

a. Sifat fisika-kimia



Gambar 1. Struktur Teobromin (Kovar dan Auterhoff, 2002)

Nama kimia teobromin adalah 3,7 dimetil ksantin, senyawa ini merupakan golongan alkaloid ksantin, struktur teobromin dapat dilihat pada gambar 1. Senyawa ini mempunyai rumus empiris $C_7H_8N_4O_2$ dengan berat molekul 180,2. Dalam bentuk murni merupakan serbuk putih rasa agak pahit (Kovar dan Auterhoff, 2002).

Tabel 1. Kelarutan Teobromin pada Beberapa Pelarut

Kelarutan dalam	air	etanol	aseton	eter	kloroform
	1:150 pada suhu $100^{\circ}C$	Tak larut	Tak larut	Tak larut	Tak larut

Kelarutan teobromin dalam air adalah 1:150 (pada suhu $100^{\circ}C$) atau sukar larut, tidak larut dalam etanol dan pelarut organik (aseton, eter, kloroform). Data kelarutan teobromin pada beberapa pelarut dapat dilihat pada tabel 1.

b. Analisis teobromin

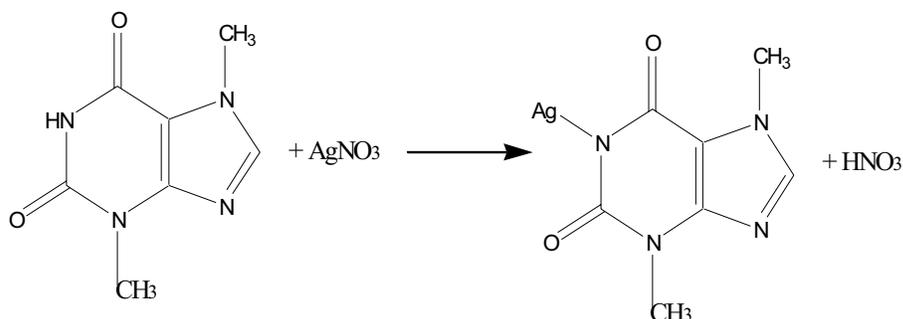
Teobromin dapat diidentifikasi kualitatif dan menunjukkan hasil yang positif dengan pereaksi Mureksid (Aurtherhoff, 2002).

Beberapa mg teobromin diuapkan dengan 5 tetes larutan hidrogen peroksida pekat dan 5 tetes asam klorida encer diatas penangas air sampai kering. Residu berwarna merah kekuningan yang terjadi pada penambahan 1 tetes larutan amonia encer akan berwarna merah violet (Roth dan Blaschke, 1998).

Penetapan kadar teobromin secara kuantitatif antara lain :

1). Metode argentometri

Teobromin dengan perak nitrat membentuk endapan dalam suasana basa. Reaksinya dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Argentometri Teobromin (Sudjadi dan Rohman, 2004)

Timbang saksama lebih kurang 500 mg teobromin, masukan dalam 125 ml aquades. Tambahkan 1 ml larutan merah fenol 0,1% dalam alkohol dan 4 ml asam sulfat 1 N. Jika perlu tambahkan asam lagi sampai larutan sedikit asam yang dapat dilihat larutannya berwarna kuning. Didihkan larutan selama 10 sampai 15 menit dan dinginkan sampai lebih kurang 40⁰C. Tambahkan natrium hidroksida 0,1 N kemudian tambahkan setetes

demu setetes asam sulfat 0,1 N sampai berwarna kuning. Tambahkan 40 ml perak nitrat 0,1 N (campur) kemudian dititrasi dengan natrium hidroksida 0,1 N sampai berwarna merah kebiruan, sedangkan kofein tidak bereaksi dengan perak nitrat karena tidak memiliki atom hidrogen yang dapat lepas (Sudjadi dan Rohman, 2004).

2). Titrasi tidak langsung menggunakan baku iodium dan tiosulfat

Dalam suasana asam teobromin direaksikan dengan iodium akan membentuk endapan periodida, $C_7H_8O_2N_4.HI.I_4$. Jumlah iodium yang bereaksi bervariasi, tergantung dari kelebihan iodium selama titrasi, kemudian kelebihan iodium dititrasi dengan natrium tiosulfat dan digunakan indikator kanji (Sudjadi dan Rohman, 2004).

3). Metode spektrofotometri-uv

Turunan ksantin menyerap kuat terhadap cahaya ultraviolet. Pada pH 6 teobromin, kofein dan teofilin menunjukkan absorbansi maksimal pada panjang gelombang antara 272 sampai 273 nm. Perubahan pH larutan hanya sedikit mengubah kedudukan maksimumnya (Sudjadi dan Rohman, 2004).

4). Metode gravimetri

Teobromin dapat disari dan ditimbang atau diendapkan dengan asam siliko tungstat (Sudjadi dan Rohman, 2004).

c. Khasiat

Teobromin dapat digunakan sebagai obat psikostimulan, seperti stimulasi pernafasan, perlemasan otot polos bronkus pada asma bronkus dan pada

kombinasi dengan ergot dapat meredakan sakit kepala migrain (Nieforth dan Cohen, 1981). Teobromin sangat efektif mengobati batuk, tiga kali lebih efektif dibanding kodein dan mempunyai efek samping yang lebih kecil daripada kodein (Anonim^c, 2004).

2. Metode titrasi bebas air

Basa dan asam yang bersifat lemah seperti alkaloid atau zat seperti alkaloid dan asam-asam organik yang sulit larut dalam air dan tidak begitu reaktif, dapat ditentukan dengan jalan titrasi dalam lingkungan yang bebas air atau pelarut bukan air (Fatah dan Musyidi, 1982).

Kesederhanaan, kecepatan, ketepatan dan ketelitian metode titrasi bebas air setara dengan metode titrasi klasik (metode titrasi dalam lingkungan air), demikian peralatannya yang digunakan, tetapi dalam titrasi bebas air ini perlu diperhatikan adanya kelembaban dan karbondioksida (Mursyidi dan Rohman, 2006).

Adanya air harus dihindari pada titrasi bebas air, karena adanya air yang merupakan basa lemah akan berkompetisi dengan basa lemah untuk bereaksi dengan asam perklorat (HClO₄) yang digunakan sebagai titran menurut reaksi:



Disamping itu dengan adanya air, maka ketajaman titik akhir juga akan berkurang. Secara eksperimen, adanya air tidak boleh lebih dari 0,05% sehingga tidak mengakibatkan pengaruh yang nyata pada pengamatan titrasi (Mursyidi dan Rohman, 2006).

Titration in water-free environment is included in the group of neutralization, because its basis is the reaction between weak protophilic groups that tend to accept electron pairs and strong protophilic compounds that can provide electron pairs so that covalent bonds (between acid and base in the appropriate solvent) (Fatah and Mursyidi, 1982).

This titration is important in choosing the solvent, titrant and indicator. The solvent used in water-free acidimetry can be neutral or acidic, the choice of solvent is determined by the characteristics of the compound. For weakly basic compounds, acidic solvents are used, such as formic acid, propionic acid, acetic anhydride and sulfonyl chloride (Mursyidi and Rohman, 2006).

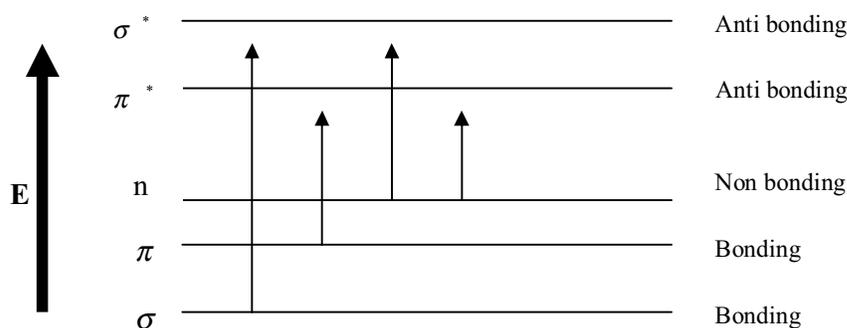
Perchloric acid is the strongest among other acids, so it is the most appropriate titrant for weak bases in water-free titration. The acids listed below in water solvent have the same strength, but in water-free environment, the strength decreases.



The endpoint can be determined by using an indicator. Indicators that can be used for weak base titration and their salts are potassium permanganate, crystal violet, methylrosaniline chloride, methyl red, alpha-naphthol benzein and malachite green. Crystal violet is the most commonly used, because it shows a clear color change at the endpoint, with excess titrant less than 0.1 ml (Fatah and Musyidi, 1982).

3. Spektrofotometri

Spektroskopi merupakan studi yang mempelajari interaksi energi cahaya dan materi. Warna-warna yang tampak dan fakta bahwa orang bisa melihat adalah akibat serapan energi oleh senyawa organik maupun anorganik (Fessenden dan Fessenden, 1986).



Gambar 3. Diagram Tingkat Energi Elektronik

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah sinar tampak tergantung pada struktur elektronik molekul. Penyerapan sejumlah energi menghasilkan transisi elektron dari orbital tingkat dasar ke orbital yang berenergi lebih tinggi dalam keadaan tereksitasi. Sistem atau gugus atom yang bertanggung jawab pada penyerapan cahaya disebut kromofor. Kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi dari σ ke σ^* ialah sistem yang mempunyai elektron pada orbital σ , sedangkan kromofor yang menyebabkan transisi elektron n ke σ^* , n ke π^* dan π ke π^* adalah sistem yang mempunyai elektron baik pada orbital molekul tidak mengikat (n) maupun pada orbital π (Mulja dan Suharman, 1995). Diagram tingkat energi elektronik dapat dilihat pada gambar 3.

Pada senyawa organik dikenal pula gugus aoksokrom, adalah gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas, sehingga menyebabkan terjadinya transisi ($n - \sigma^*$). Terikatnya gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju ke arah panjang gelombang yang lebih panjang (pergeseran merah = *bathochromic shift*) disertai peningkatan intensitas (efek *hiperkromik*) (Mulja dan Suharman, 1995). Adanya peristiwa konjugasi juga menyebabkan pergeseran gelombang yang lebih panjang. *Bathochromic shift* (Skoog, 1985).

Spektrofotometri UV-Vis adalah anggota teknik analisis spektroskopik dengan menggunakan sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190nm-380nm) dan sinar tampak (380nm-780nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995).

Spektrofotometer sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri atas 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 (Khopkar, 1990).

Dalam mempelajari analisis kuantitatif dari absorpsi radiasi, berkas radiasi dikenakan pada sampel dan kemudian intensitas radiasi yang diteruskan atau ditransmisikan diukur. Radiasi yang diabsorpsi oleh sampel ditentukan dengan membandingkan intensitas dari berkas radiasi yang diteruskan bila tidak ada zat penyerap dan dengan intensitas yang diteruskan bila ada zat penyerap. Jika radiasi

mengenai sampel memiliki energi sesuai dengan yang dibutuhkan untuk menyebabkan terjadinya perubahan energi, maka terjadilah absorpsi (Sudarmadji, dkk., 1996).

Penentuan kadar secara spektrofotometri sinar tampak dilakukan dengan mengukur absorbansi maksimal. Apabila senyawa tidak berwarna maka senyawa diubah dulu menjadi suatu senyawa berwarna melalui reaksi kimia dan absorbansi ditentukan dalam daerah sinar tampak (Roth dan Blaschke, 1998).

Menurut hukum *Lambert-Beer* konsentrasi dapat dihitung dari ketebalan lapisan dan absorban. Koefisien ekstingsi molar ϵ pada panjang gelombang dan pelarut tertentu untuk setiap senyawa merupakan tetapan senyawa dan sesuai dengan ekstingsi larutan 1 molar dengan ketebalan 1 cm. Koefisien ekstingsi molar ϵ dapat diganti dengan menggunakan ekstingsi spesifik $E_{1\text{cm}}^{1\%}$. Harga ini memberikan absorban larutan 1% (b/v) dengan ketebalan lapisan 1 cm tanpa mengetahui masa molar senyawanya, sehingga dihasilkan persamaan sebagai berikut:

$$A = E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot c \cdot d$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = \text{Ekstingsi spesifik (ml.g}^{-1}\text{.cm}^{-1}\text{)}$$

$$c = \text{konsentrasi senyawa terlarut (g/100ml larutan)}$$

$$d = \text{ketebalan lapisan (cm)}$$

(Roth dan Blaschke, 1998)

Analisis dengan spektrofotometer UV-Vis selalu melibatkan pembacaan absorban radiasi elektromagnetik oleh molekul atau radiasi elektromagnetik yang diteruskan. Kedua hal tersebut dikenal sebagai absorban (A) tanpa satuan atau transmittan dengan satuan persen (%T). Apabila suatu larutan mendapat radiasi

berupa sinar polikromatik, yaitu sinar yang terdiri atas beberapa macam warna (polikromatis), maka hanya sinar dengan panjang gelombang tertentu yang diserap, sedang sinar dengan panjang gelombang lain diteruskan melalui larutan tersebut. Sinar mempunyai warna yang tidak diserap, akan diteruskan. Warna yang diteruskan sebenarnya adalah warna larutan tersebut, sedangkan warna komplementer dari warna itu tidak diteruskan atau yang diserap, yaitu warna seperti yang terlihat oleh mata (Sudarmadji, dkk., 1996). Beberapa warna dan warna komplementer dalam spektrum cahaya tampak dalam rentang panjang gelombang yang dimiliki warna tersebut dapat dilihat dalam tabel 2.

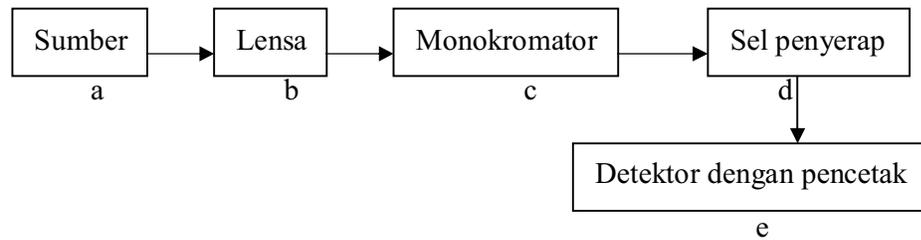
Tabel 2. Panjang Gelombang dan Warna Komplementernya

Panjang Gelombang (nm)	Warna	Warna Komplementer
400 – 435	Lembayung (violet)	Kuning-Hijau
435 – 480	Biru	Kuning
480 – 490	Hijau-Biru	Jingga
490 – 500	Biru-Hijau	Merah
500 – 560	Hijau	Ungu (purple)
560 – 580	Kuning-Hijau	Lembayung (violet)
580 – 595	Kuning	Biru
595 – 610	Jingga	Hijau biru
610 – 750	Merah	Biru-Hijau

Panjang gelombang yang dipakai dalam suatu analisis dipilih sedemikian rupa sehingga zat yang dianalisis akan mengabsorpsi radiasi pada panjang gelombang tersebut dan sedapat mungkin tidak dipengaruhi oleh kemungkinan adanya zat pengganggu ataupun adanya variasi dalam prosedurnya. Bila zat yang

dianalisis berwarna, maka warna komplementernya merupakan petunjuk kira-kira panjang gelombang yang digunakan (Sudarmadji, dkk., 1996).

Komponen pokok spektrofotometer modern seperti terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Diagram Sederhana Spektrofotometer (Sastrohamidjojo, 2001)

Keterangan :

- a. Sumber tenaga radiasi stabil
- b. Sistem terdiri atas lensa-lensa, cermin, celah dan lain lain
- c. Monokromator untuk mengubah radiasi-radiasi menjadi komponen panjang gelombang tunggal
- d. Tempat cuplikan transparan
- e. Detektor radiasi dihubungkan dengan sistem meter atau pencatat

4. Penetapan kadar teobromin secara spektrofotometri sinar tampak menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu

Pereaksi Folin-Ciocalteu digunakan pada metode Lowry, yang dapat digunakan untuk menentukan protein. Metode ini dapat mengukur kandungan protein cuplikan hingga 5µg. Warna biru yang terjadi pada pereaksi Folin-Ciocalteu disebabkan reaksi antara sisa asam amino tirosin, fenilalanin, sistein dan triptopan pada protein dengan Cu^{2+} dalam larutan alkalis akan terjadi endapan

Cu_2O . Kupro oksida akan mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi *molybdenum blue* berwarna biru (Tranggono dan Setiaji, 1989).

Reaksi yang terjadi adalah reaksi reduksi-oksidasi, secara umum pereaksi Folin-Ciocalteu bersifat oksidator. Dimana teobromin dengan kupri sulfat dalam suasana alkalis membentuk Cu_2O . Kupro oksida akan mereduksi garam fosfomolibdat fosfotungstat yang terkandung dalam Folin-Ciocalteu menjadi *molybdenum blue* yang berwarna biru. Senyawa yang berwarna biru tersebut dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650-750nm (Sudarmadji, 1996). Untuk mempercepat reaksi dibantu energi dari luar melalui pemanasan tidak langsung pada suhu 100°C selama 10 menit baru didiamkan pada suhu ruang.

D. Hipotesis

1. Senyawa berwarna hasil reaksi antara teobromin dan pereaksi Folin-Ciocalteu dapat digunakan untuk menetapkan kadar teobromin secara spektrofotometri sinar tampak.
2. Metode penetapan kadar teobromin secara spektrofotometri sinar tampak menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu dapat memenuhi ketepatan, ketelitian dan kepraktisan yang sama dengan metode titrasi bebas air.