

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

**PENETAPAN KADAR FLOROTANIN DALAM FRAKSI ETIL ASETAT
ALGA HIJAU *ULVA sp.* DENGAN METODE KOLORIMETRI
FOLIN CIOCALTEAU**

SKRIPSI

**Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm.)
Program Studi Ilmu Farmasi**



Oleh:

Elisabeth Budi Gunawan

NIM: 048114038

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
YOGYAKARTA
2008**

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

**PENETAPAN KADAR FLOROTANIN DALAM FRAKSI ETIL ASETAT
ALGA HIJAU *ULVA sp.* DENGAN METODE KOLORIMETRI
FOLIN CIOCALTEAU**

SKRIPSI

**Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm.)
Program Studi Ilmu Farmasi**



Oleh:

Elisabeth Budi Gunawan

NIM: 048114038

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
YOGYAKARTA
2008**

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

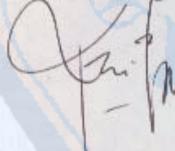
Penelitian untuk Skripsi

**PENETAPAN KADAR FLOROTANIN DALAM FRAKSI ETIL ASETAT
ALGA HIJAU *ULVA sp.* DENGAN METODE KOLORIMETRI
FOLIN CIOCALTEAU**

Yang diajukan oleh :
Elisabeth Budi Gunawan
NIM : 048114038

telah disetujui oleh :

Pembimbing



Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.

Tanggal : 14 Juli 2008

Pengesahan Skripsi Berjudul

**PENETAPAN KADAR FLOROTANIN DALAM FRAKSI ETIL ASETAT
ALGA HIJAU *ULVA sp.* DENGAN METODE KOLORIMETRI
FOLIN CIOCALTEAU**

Oleh :
Elisabeth Budi Gunawan
NIM : 048114038

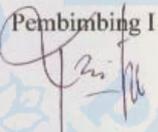
Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi
Universitas Sanata Dharma
pada tanggal : 26 JUNI 2008

Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Sanata Dharma

Dekan

Rita Subadi, M.Si., Apt.

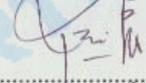
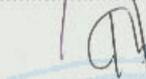
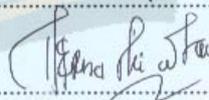
Pembimbing I


Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.

Panitia Penguji :

1. Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.
2. Christine Patramurti, M.Si., Apt
3. Erna Triwulandari, M.Si., Apt.

Tanda Tangan


.....

.....

.....

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

HALAMAN PERSEMBAHAN

**“Pemenang adalah orang-orang yang pantang menyerah.
Bahkan ketika segala sesuatu berjalan dengan sangat berat.”**

(on Being A Champion by **Mattie Stephanek**)

Amagumo ga kireta nara

Nureta michi kagayaku

Yami dake ga oshiete kureru

Tsuyoi tsuyoi hikari

Tsuyoki mae he susume.....

(Be strong...Go forward....Move ahead)

(Only Human, One Litter of Tears)



Karya ini kupersembahkan untuk orang-orang yang kukasihi

”Jesus Christ”

Papi, Mami, Meta, Kfo Paulus

Teman-temanku dan Almamaterku

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya mahasiswa Universitas Sanata Dharma :

Nama : Elisabeth Budi Gunawan

Nomor Mahasiswa : 048114038

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma karya ilmiah saya yang berjudul :

“Penetapan Kadar Florotanin Dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau *Ulva sp.* Dengan Metode Kolorimetri Folin Ciocalteu”

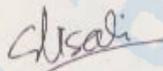
beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan demikian saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma hak untuk menyimpan, mengalihkan dalam bentuk media lain, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data, mendistribusikan secara terbatas, dan mempublikasikannya di Internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya maupun memberikan royalti kepada saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Yogyakarta

Pada tanggal : 14 Juli 2008

Yang menyatakan



(Elisabeth Budi Gunawan)

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat, kasih dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul **“Penetapan Kadar Florotanin dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau *Ulva sp.* dengan Metode Kolorimetri Folin Ciocalteu”**. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.) Program studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.

Dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis telah mendapatkan bantuan dan dukungan baik berupa materiil, moral maupun spiritual dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Rita Suhadi, M.Si., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
2. Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si. selaku dosen pembimbing yang dengan kesabarannya membimbing, memberi saran dan kritik sejak penyusunan proposal hingga selesainya skripsi ini.
3. Christine Patramurti, M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan, saran dan kritik yang membangun selama penelitian.
4. Erna Triwulandari, M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan, saran dan kritik yang membangun bagi penulis.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

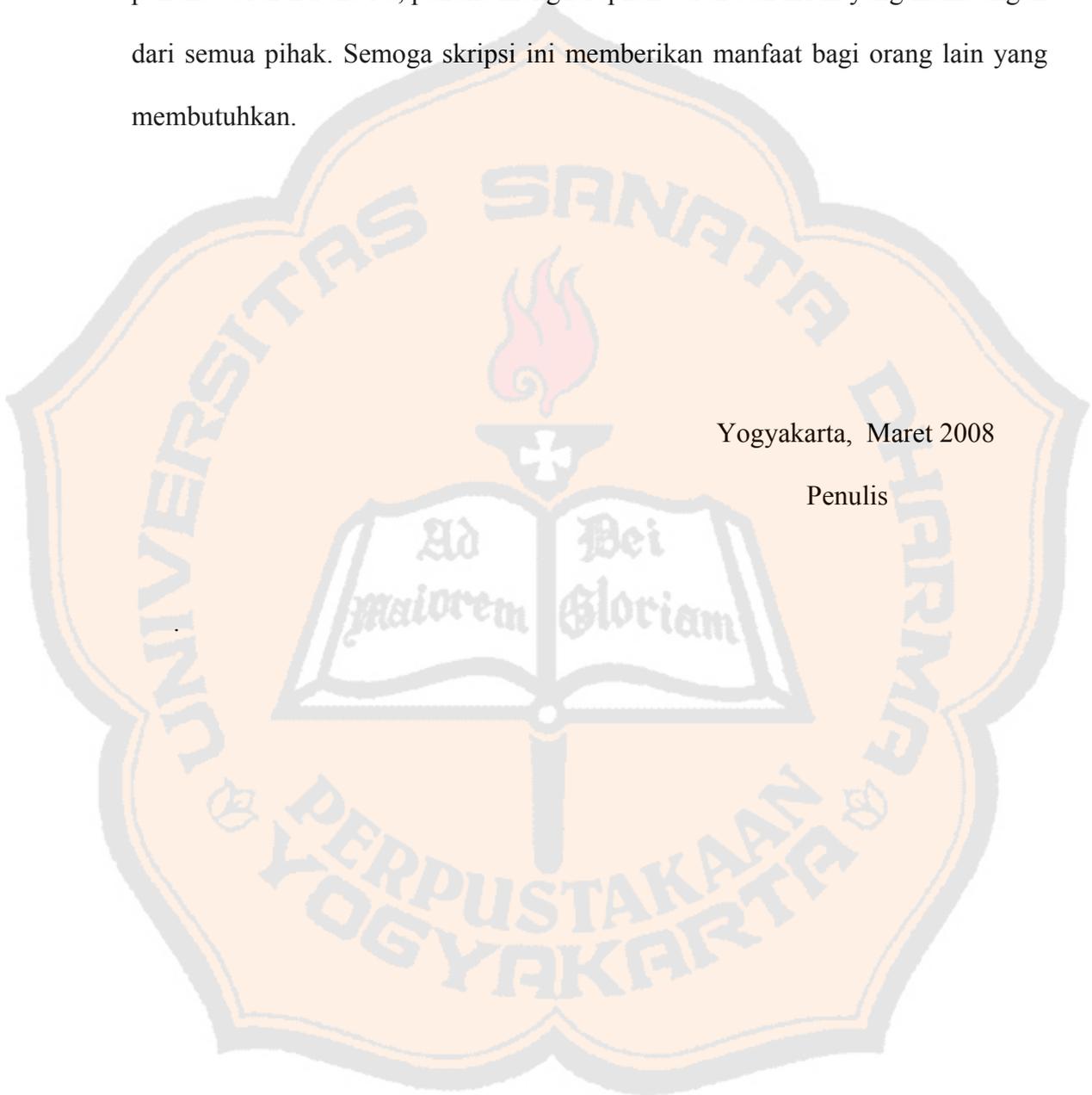
5. Dra. A. Nora Iska H., M.Si., Apt. selaku penanggungjawab proyek penelitian payung yang telah meluangkan waktu dan tenaga selama penelitian.
6. Papi dan mami atas segala kasih sayang, dukungan, perhatian, nasehat dan doa yang senantiasa menyertai penulis. Terima kasih atas semua yang telah mami dan papi berikan.
7. My lovely sister “meta”, terima kasih telah berbagi segalanya dengan penulis.
8. Kho Paulus, orang yang sangat penulis kasihi.
9. Rekan tim penelitian alga (Dewi, Fanny, Andri, Angel, Hendri dan Dipta) yang selama ini telah membantu, menemani, mendukung dan menyemangati penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
10. Segenap staf laboran terutama laboran lantai III, IV, dan kepala gudang (mas Otok) atas masukan, bantuan, kebersamaan dan kerjasamanya selama penelitian.
11. Teman-teman angkatan 2004 (terutama Lia, Liancy, Leo, BA, Retry, Wiwid, Elvan, Ryan, Fajar) atas persahabatan dan kekompakan selama kuliah
12. Semua anak kost Dewi yang senantiasa memberikan keceriaan, persahabatan, bantuan, dan kebersamaan.
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih memiliki kekurangan mengingat keterbatasan kemampuan dan pengetahuan penulis. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak. Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi orang lain yang membutuhkan.

Yogyakarta, Maret 2008

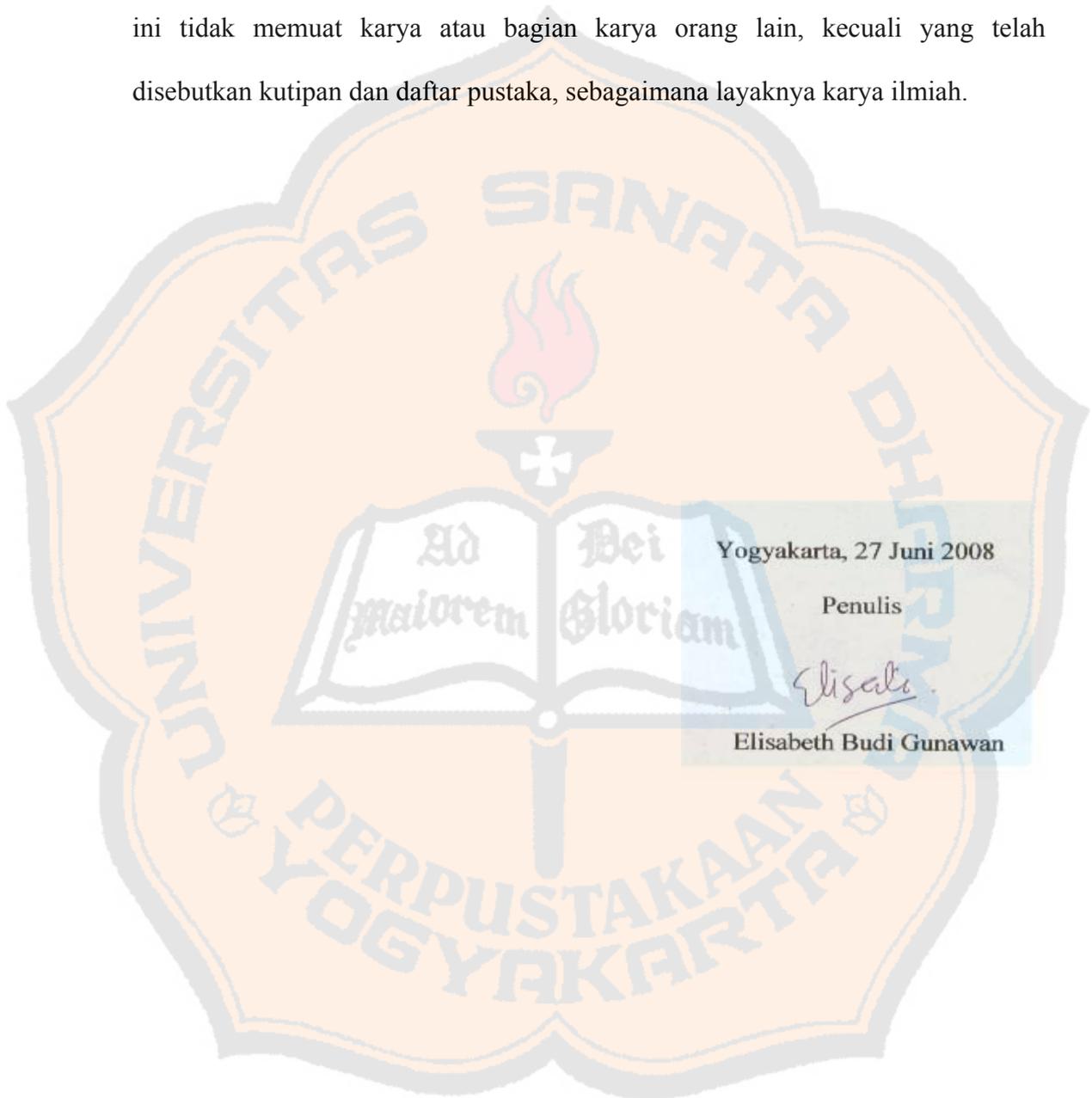
Penulis



PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini tidak memuat karya atau bagian karya orang lain, kecuali yang telah disebutkan kutipan dan daftar pustaka, sebagaimana layaknya karya ilmiah.



Yogyakarta, 27 Juni 2008

Penulis

Elisabeth

Elisabeth Budi Gunawan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
PRAKATA	vii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
INTISARI	xix
<i>ABSTRACT</i>	xx
BAB I. PENGANTAR	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Keaslian Karya	3
D. Manfaat Penelitian	4
E. Tujuan Penelitian	4
BAB II. PENELAAHAN PUSTAKA.....	6
A. Tanaman Laut Alga.....	6

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

B. Alga Hijau	7
C. Algal Polifenol (Florotanin).....	9
D. Tahap Isolasi Florotanin.....	10
1. Ekstraksi.....	10
2. Fraksinasi	11
E. Metode Kolorimetri dengan Spektrofotometri Visibel	12
1. Kolorimetri.....	12
2. Spektrofotometri Visibel.....	15
F. Metode Folin Ciocalteau.....	21
G. Kesalahan dalam Metode Analisis.....	22
1. Kesalahan Sistematis (<i>determinate errors</i>).....	22
2. Kesalahan Tidak Sistematis (<i>indeterminate errors</i>)	23
H. Keterangan Empiris.....	24
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	26
A. Jenis Rancangan Penelitian.....	26
B. Variabel dan Definisi Operasional.....	26
1. Variabel Penelitian.....	26
2. Definisi Operasional.....	26
C. Bahan atau Materi Penelitian.....	27
D. Alat Penelitian.....	28
E. Tata Cara Penelitian.....	28
1. Preparasi Sampel Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	28

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

2. Penetapan Kadar Air Serbuk Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	29
3. <i>Screening</i> Fitokimia Alga Hijau.....	29
4. Isolasi Florotanin pada Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	30
5. Optimasi Metode Kolorimetri dengan Folin Ciocalteau.....	31
a. Pembuatan larutan uji dan larutan standar.....	31
b. Penentuan <i>Operating Time</i> (OT).....	31
c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}).....	32
6. Estimasi Kadar Polifenol Total dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	32
a. Perlakuan pada larutan standar floroglusinol.....	32
b. Perlakuan fraksi etil asetat alga hijau <i>Ulva sp.</i>	33
F. Analisis Hasil	34
1. Uji Kualitatif untuk Tanin dan Polifenol.....	34
2. Penetapan Kadar Florotanin dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau <i>Ulva sp.</i> Menggunakan Metode Folin Ciocalteau.....	34
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
A. Preparasi Sampel Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	35
B. <i>Screening</i> Fitokimia Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	40
C. Isolasi Florotanin dari Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	42
D. Prinsip Reaksi Kolorimetri dengan Folin Ciocalteau.....	44
E. Optimasi Metode Kolorimetri dengan Folin Ciocalteau.....	48

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

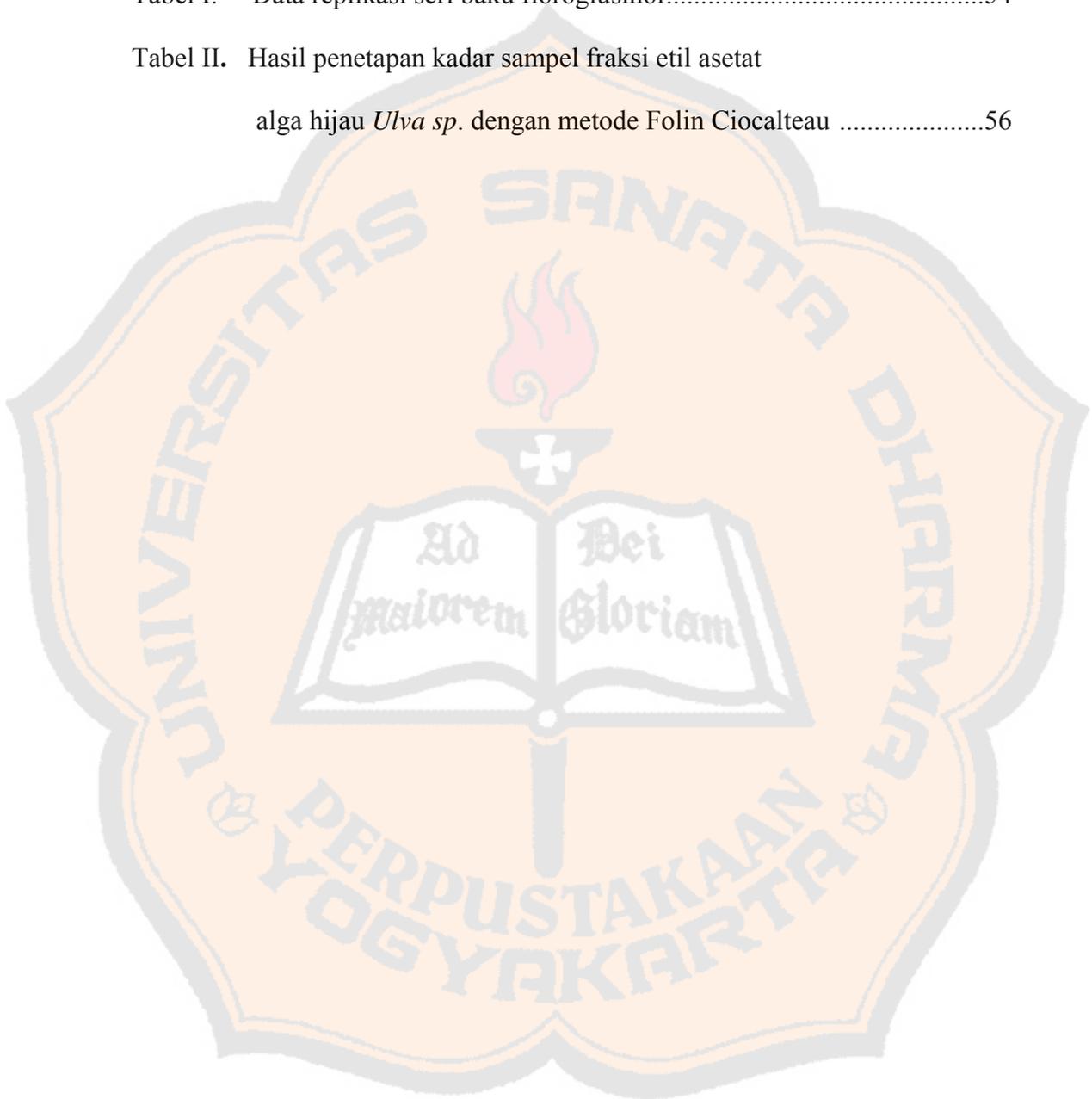
1. Penentuan <i>Operating Time</i> (OT).....	48
2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}).....	50
3. Pembuatan Kurva Baku Floroglusinol.....	54
F. Estimasi Kadar Florotanin Dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	55
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	58
A Kesimpulan	58
B Saran.....	58
C Keterbatasan Penelitian.....	58
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	64
BIOGRAFI PENULIS	81

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur molekul floroglusinol	10
Gambar 2. Diagram tingkat energi elektronik.....	17
Gambar 3. Diagram alir instrumentasi spektrofotometer visibel.....	20
Gambar 4. Proses oksidasi fenol oleh enzim polifenol oksidase	37
Gambar 5. Reaksi pada penetapan kadar air dengan metode Karl Fischer.....	40
Gambar 6. Reaksi pembentukan kompleks warna gugus fenolik dan FeCl ₃	41
Gambar 7. Kesetimbangan reaksi floroglusinol dalam suasana basa	45
Gambar 8. Reaksi reduksi-oksidasi antara senyawa fenolik dan reagen Folin Ciocalteu.....	45
Gambar 9. Kompleks oktahedral-tetrahedral fosfomolibdat	47
Gambar 10. Hasil pembacaan <i>operating time</i> floroglusinol kadar 4,0 ppm yang telah direaksikan dengan pereaksi Folin Ciocalteu.....	49
Gambar 11. Hasil pembacaan λ_{maks} floroglusinol pada tiga konsentrasi (A = 1,0 ppm; B = 3,0 ppm; dan C = 6,0 ppm) setelah direaksikan dengan pereaksi Folin Ciocalteu.....	52
Gambar 12. Kurva baku hubungan kadar dan absorbansi floroglusinol setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteu.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Data replikasi seri baku floroglusinol.....	54
Tabel II.	Hasil penetapan kadar sampel fraksi etil asetat alga hijau <i>Ulva sp.</i> dengan metode Folin Ciocalteu	56

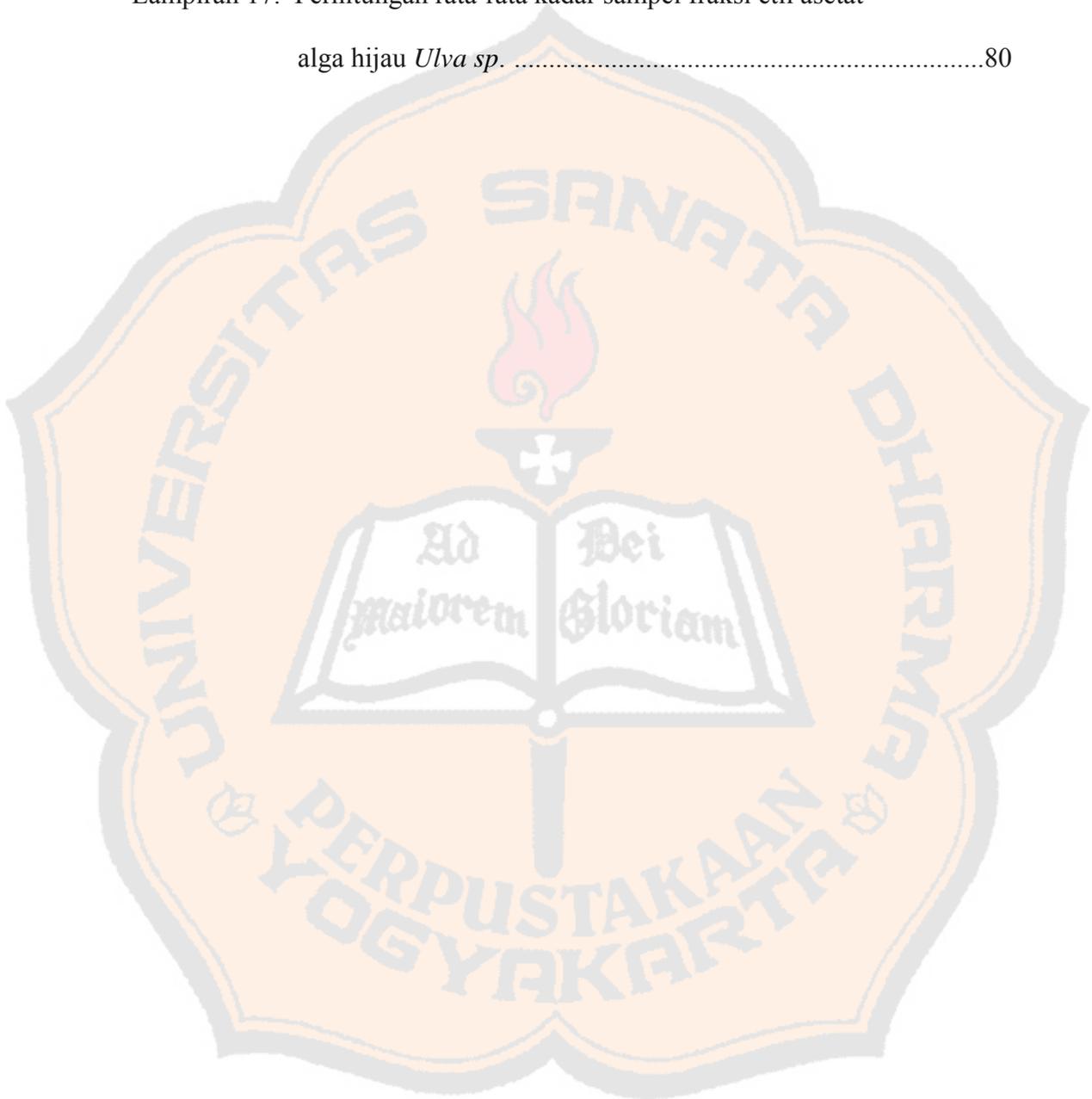


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat keterangan hasil determinasi genus alga.....	64
Lampiran 2.	Data perhitungan kadar air serbuk alga hijau <i>Ulva sp.</i> dengan metode <i>Karl Fischer</i>	65
Lampiran 3.	Hasil <i>screening</i> fitokimia alga hijau <i>Ulva sp.</i>	67
Lampiran 4.	Foto uji kualitatif alga hijau <i>Ulva sp.</i>	67
Lampiran 5.	Data penimbangan replikasi seri baku floroglusinol	69
Lampiran 6.	Perhitungan seri kadar baku floroglusinol.....	70
Lampiran 7.	Hasil <i>Operating Time</i> (OT)	72
Lampiran 8.	Hasil <i>scanning</i> λ_{\max} kadar floroglusinol 1,0 ppm setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteau	73
Lampiran 9.	Hasil <i>scanning</i> λ_{\max} kadar floroglusinol 3,0 ppm setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteau	73
Lampiran 10.	Hasil <i>scanning</i> λ_{\max} kadar floroglusinol 6,0 ppm setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteau	74
Lampiran 11.	Hasil <i>scanning</i> panjang gelombang maksimum (λ_{\max}).....	75
Lampiran 12.	Hasil pembacaan absorbansi seri baku floroglusinol pada ketiga λ_{\max}	76
Lampiran 13.	Kurva baku floroglusinol.....	77
Lampiran 14.	Data penimbangan sampel fraksi etil asetat Alga Hijau <i>Ulva sp.</i>	77

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

- Lampiran 15. Data absorbansi sampel fraksi etil asetat Alga Hijau *Ulva sp.* 78
- Lampiran 16. Perhitungan kadar sampel fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* 78
- Lampiran 17. Perhitungan rata-rata kadar sampel fraksi etil asetat
alga hijau *Ulva sp.*80



INTISARI

Alga laut merupakan salah satu kekayaan laut Indonesia yang sangat potensial, namun belum dimanfaatkan secara maksimal baik sebagai nutrisi makanan maupun agen biomedis. Salah satunya, alga hijau *Ulva sp.* yang cukup melimpah di perairan Indonesia. Alga hijau mengandung mikronutrien polifenol alga yang dikenal sebagai florotanin. Senyawa ini berupa unit-unit floroglusinol (1,3,5-trihidroksibenzena) yang berbeda dari tumbuhan terestrial.

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan florotanin dari alga hijau *Ulva sp.* serta menetapkan kadar florotanin dalam fraksi etil asetat alga tersebut. Isolasi dilakukan menggunakan metode sokhletasi dengan pelarut metanol. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan kloroform, akuades, dan etil asetat untuk mendapatkan florotanin.

Konsentrasi polifenol total ditetapkan secara spektrofotometri dengan metode Folin Ciocalteu, menggunakan standar floroglusinol yang dibuat seri konsentrasi baku 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 ; 5,0 dan 6,0 ppm dalam pelarut aseton 75 %. Standar floroglusinol dan sampel dibaca pada panjang gelombang maksimum 750,1 nm. Konsentrasi polifenol total dalam fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* yang didapat adalah $10,63 \pm 0,38$ mg PGE (*Phloroglucinol Equivalent*)/g fraksi.

Kata kunci : florotanin, polifenol, alga hijau *Ulva sp.*, metode Folin Ciocalteu

ABSTRACT

Seaweed Algae is one of Indonesian's sea treasures that really potential, but still haven't been used maximally as well yet, either as food nutrition or biomedical agents. One of them is green algae *Ulva sp.* that abundant enough in Indonesian waters. The green algae contains algae polyphenols micronutrient called phlorotannins. This compound is polymer with phloroglucinol units monomer (1,3,5-trihydroxybenzene), that is differ from terrestrial plant polyphenols.

The aim of this study is for getting phlorotannin from green algae *Ulva sp.* and determining phlorotannin concentration in ethyl acetate fractional of alga that mentioned. Isolation have been done by soxhletation method with methanol solvent. The viscous extract that was gained, than was fractionated with chloroform, aquadest and ethyl acetate to gain phlorotannin.

Concentration of total polyphenols was determined by spectrophotometric with Folin Ciocalteau method. Using phloroglucinol standard that was made in calibration series 1.0 ; 2.0 ; 3.0 ; 4.0 ; 5.0 and 6.0 ppm with acetone 75 % solvent. The phloroglucinol standard and sample was scanned at 750.1 nm the maxima wavelength. Concentration of total polyphenols in ethyl acetate fractional of green algae *Ulva sp.* has been investigated was 10.63 ± 0.38 mg PGE (Phloroglucinol Equivalent)/g fraction.

Key words : phlorotannin, polyphenols, green algae *Ulva sp.*, Folin Ciocalteau method

BAB I

PENGANTAR

A. Latar Belakang

Senyawa fenolik alam seperti asam kafeat, asam ferulat, kuersetin, apigenin, genistein, resveratrol, asam norhidroguaiaretat, asam karnosat, silimarin, polifenol teh, dan tanin mampu melindungi kulit terhadap radiasi sinar UV yang menyebabkan iritasi, kemerahan dan kanker kulit. Senyawa fenolik tersebut memiliki struktur berupa benzene dan gugus hidroksil (-OH) (Svobodova *et al*, 2003) .

Pencarian senyawa fenolik alam untuk mendapat agen perlindungan kulit yang memiliki aktivitas antioksidan dan pengabsorpsi radiasi sinar UV terus dilakukan. Namun, selama ini pencarian tersebut masih terbatas pada tumbuhan terestrial seperti tanaman teh (Dahuri, 2003). Sebagai negara yang dikelilingi oleh lautan, Indonesia mempunyai panjang pantai ± 81.000 km dengan luas perairan pantai $\pm 6.846.000$ km². Ini menunjukkan bahwa Indonesia memiliki potensi yang besar untuk mengembangkan dan memanfaatkan kekayaan lautnya terutama rumput laut (Sulistiyowati, 2003).

Di Indonesia hanya alga merah yang memiliki nilai ekspor tinggi. Alga lain, seperti alga hijau belum dibudidayakan sehingga memiliki nilai ekonomis yang rendah. Padahal, alga hijau cukup melimpah di perairan Indonesia sehingga dapat dimanfaatkan secara maksimal baik sebagai makanan ataupun agen biomedis.

Salah satu mikronutrien dari tumbuhan alga adalah polifenol yang dikenal sebagai florotanin yang merupakan senyawa polifenol yang tidak ditemukan pada tumbuhan terestrial, tetapi hanya pada tumbuhan alga (Burtin, 2003). Beberapa aktivitas biologik florotanin yang telah diteliti adalah antiproliferasi dan antioksidan (Nakamura *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2005a; Athukorala *et al.*, 2006; Yuan dan Walsh, 2006), antiinflamasi (Shin *et al.*, 2006), inhibitor matriks metalloproteinase (Kim *et al.*, 2006), sitoprotektif terhadap stres oksidatif (Kang *et al.*, 2005b), dan inhibitor HIV-1 *reverse transcriptase* dan protease (Ahn *et al.*, 2004).

Demikian aktivitas florotanin sangat berguna bagi kehidupan manusia, namun penelitian mengenai florotanin dalam alga hijau masih sangat terbatas. Dalam rangka penelitian mengenai penghambatan oksidatif kulit oleh fraksi alga polifenol (florotanin) yang merupakan bagian dari program hibah A3 Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, maka sebagai langkah awal eksplorasi, perlu dilakukan penelitian florotanin secara kualitatif dan kuantitatif pada tanaman alga hijau *Ulva sp.* Penelitian ini dapat dikembangkan dengan uji penelitian lanjutan untuk mengetahui potensi aktivitas florotanin sebagai agen kosmetika antioksidan.

Penelitian ini diketuai oleh Agnes Nora Iska Harnita dan dilakukan secara bersama-sama oleh Elisabeth Budi Gunawan, Dewi Riana Primawati, Maria Stephanie, Hendry Kurniawan, Andriani Noerlita Ningrum, Angela Woro Dwi Priharina, dan Maria Delarosa Dipta Dharmesti.

Penelitian mengenai estimasi kandungan polifenol total pada rumput laut dan ekstraknya yang dihitung ekuivalen terhadap floroglusinol pernah dilakukan oleh Zhang *et al.* (2006) dengan metode sederhana berdasarkan reaksi kolorimetri Folin-Ciocalteu. Metode ini memiliki keunggulan dalam hal sensitivitasnya mengukur senyawa-senyawa yang memiliki gugus fenolik hingga tingkat *part per million* (ppm), dan sederhana karena hanya membutuhkan reagen Folin Ciocalteu sehingga metode ini masih digunakan hingga saat ini.

B. Perumusan Masalah

Dari latar belakang diatas, maka permasalahan dalam penelitian ini difokuskan pada florotanin dalam fraksi etil asetat yang diisolasi dari alga hijau *Ulva sp.* yang tersebar di pantai selatan Yogyakarta. Rumusan permasalahan adalah sebagai berikut :

1. Apakah florotanin dalam fraksi etil asetat dapat diisolasi dari alga hijau *Ulva sp.* untuk diukur dengan metode Folin Ciocalteu?
2. Berapakah kadar florotanin dalam fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* yang ditetapkan menggunakan metode Folin Ciocalteu?

C. Keaslian Karya

Sepengetahuan peneliti, penelitian tentang penetapan kadar florotanin dalam fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* dengan metode Folin Ciocalteu belum pernah dilakukan.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan pengetahuan mengenai kandungan florotanin hasil isolasi dari alga hijau *Ulva sp.*

2. Manfaat metodologis

Penelitian ini dapat menjadi acuan tentang penggunaan metode Folin Ciocalteu dalam penetapan kadar florotanin.

3. Manfaat praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan informasi kepada masyarakat mengenai kandungan florotanin pada alga hijau *Ulva sp.* yang bermanfaat dalam industri makanan, farmasi, dan kosmetik.

E. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum:

Tujuan umum penelitian ini adalah menetapkan kadar florotanin alga hijau *Ulva sp.*

2. Tujuan khusus:

Tujuan khusus penelitian ini dapat diuraikan sebagai berikut :

- a. Mengisolasi florotanin dalam fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* untuk diukur dengan metode Folin Ciocalteu

- b. Mengetahui kadar florotanin dalam alga hijau *Ulva sp.* menggunakan metode Folin Ciocalteu.



BAB II

PENELAAHAN PUSTAKA

A. Tanaman Laut Alga

Rumput laut adalah tumbuhan yang tidak dapat dibedakan antara bagian akar, batang dan daun. Semua bagian tumbuhannya disebut *thallus*. Berdasarkan ukurannya, dibedakan menjadi dua golongan yaitu mikro-algae dan makro-algae. Kedua kelompok alga tersebut sebagian besar hidup di laut. Alga yang hidup di laut, ada yang melekat di dasar laut atau melayang-layang mengikuti gerakan arus laut. Kelompok tumbuhan ini mempunyai peranan yang sangat besar di lingkungan laut, karena dapat menghasilkan oksigen yang sangat dibutuhkan oleh semua penghuni laut (Anonim,1979).

Berdasarkan kandungan pigmen yang terdapat dalam *thallus* rumput laut, maka rumput laut dapat digolongkan menjadi tiga yaitu alga hijau, merah dan coklat (Anonim,1979).

Makroalga (alga coklat, alga hijau, dan alga merah) merupakan tumbuhan laut yang dikonsumsi sehari-hari sebagai sayuran secara turun-temurun di Asia. Banyak penelitian epidemiologi yang mengaitkan antara konsumsi alga dan manfaatnya bagi kesehatan. Makroalga telah banyak dieksplorasi di negara barat sebagai sumber *phycocolloid* seperti alginat, karagenan, dan agar. Makroalga mengandung makronutrien dan mikronutrien yang mempunyai efek protektif terhadap kesehatan. Makroalga merupakan sumber polisakarida yang tinggi (alginat dan fucoidan dari alga coklat, karagenan dan agar dari alga merah), makronutrien seperti mineral yang tinggi (yodium dari alga coklat dan kalsium),

protein dan asam amino (pikobiliprotein dari alga merah dan biru), lipid dan asam lemak (asam linoleat dari alga hijau, asam eikosapentenoat dan asam arakidonat), dan mikronutrien (vitamin C, vitamin E, polifenol, dan karotenoid) (Burtin, 2003). Polifenol yang terkandung dalam alga diharapkan dapat bermanfaat sebagai antioksidan dan bahan aktif dalam sediaan *sunscreen* karena mampu mengabsorpsi sinar UV.

B. Alga Hijau

Alga hijau *Ulva sp.* termasuk dalam orde *Ulvales* dan famili *Ulvaceae* (Al Amin dan Razali, 1997). Alga hijau memiliki kandungan nutrisi yang melimpah antara lain polisakarida, protein, lipid, vitamin (terutama vitamin C dan vitamin E), polifenol alga (florotanin), dan karotenoid. Kandungan nutrisi Alga hijau sangat berguna untuk menunjang kesehatan yaitu sebagai bahan makanan dan industri nutraceutical (Burtin, 2003).

Alga hijau mengandung polisakarida berupa *xylan* dan *ulvan* pada dinding selnya. *Ulvan* tidak mudah dicerna ketika terpapar oleh bakteri dalam usus halus manusia, maka dapat digunakan sebagai *dietary fibre*. Berbeda dengan *ulvan*, *xylan* dapat terdegradasi secara cepat dan sempurna oleh bakteri di usus halus manusia. Alga hijau memiliki kandungan *fibre* total sebesar 38,1 % (21,8 % merupakan *water soluble fibre* dan 16,8 % merupakan *water insoluble fibre*). *Water soluble fibre* dan *water insoluble fibre* memiliki efek yang berbeda pada manusia. *Water soluble fibre* berhubungan dengan efek hipokolesterolemia dan hipoglikemik, sedangkan *water insoluble fibre* berhubungan dengan penurunan waktu transit pada saluran cerna (Burtin, 2003).

Berbeda dengan alga coklat, alga hijau memiliki kandungan fenol yang rendah dan protein yang tinggi. Kandungan protein dan asam amino pada alga hijau secara umum sekitar 10-30 % dari berat kering. Namun kandungan protein pada *Ulva sp.* yaitu sekitar 15-20 % dari berat kering. Protein tersebut mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik seperti pepsin, pankreatin, dan pronase (Burtin, 2003).

Kandungan lipid alga hijau sekitar 1-5 % dari berat kering. Lipid yang terkandung dalam alga hijau merupakan *polyunsaturated fatty acid* yaitu asam omega 3 dan omega 6. Asam omega ini berperan dalam mencegah penyakit kardiovaskular, osteoarthritis, dan diabetes. Alga hijau sendiri kaya akan asam alpha linoleat (omega 3; C18:3) (Burtin, 2003).

Alga hijau kaya akan vitamin seperti vitamin C dengan level sekitar 500 hingga 3000 mg/kg dari berat kering. Vitamin C ini berguna untuk meningkatkan sistem imun, mengaktifkan absorpsi besi ke dalam usus halus, mengontrol jaringan konjungtiva, menangkap radikal bebas dan regenerasi vitamin E. Alga hijau juga mengandung vitamin E walaupun tidak sebanyak pada alga coklat. Vitamin E sendiri dapat menghambat oksidasi dari lipoprotein, dan berperan dalam rantai asam arachidonat dengan menghambat pembentukan prostaglandin dan tromboxan. Berbeda dengan alga coklat yang mengandung alpha, beta dan gamma tocopherol, alga hijau hanya mengandung alpha tocopherol yang berperan dalam meningkatkan produksi nitrit oksida dan *nitric oxide synthase activity* (cNOS) serta berperan dalam mencegah penyakit kardiovaskular (Burtin, 2003).

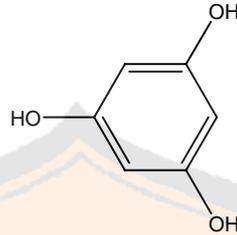
Kandungan polifenol dalam alga berbeda dengan polifenol pada tanaman terestrial. Polifenol dalam alga disebut florotanin yang berperan dalam mencegah penyakit yang berhubungan dengan stress oksidatif (Burtin, 2003).

Karotenoid yang terkandung dalam alga hijau mirip dengan karotenoid pada tanaman tingkat tinggi yaitu B-carotene, lutein, violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin dan neoxanthin. Karotenoid merupakan antioksidan kuat yang mampu mencegah penyakit yang berhubungan dengan stress oksidatif seperti menurunkan resiko terhadap penyakit kardiovaskular, kanker (B-carotene), dan penyakit optalmologikal (lutein, zeaxanthin) (Burtin, 2003).

C. Algal Polifenol (Florotanin)

Algal polifenol atau lebih dikenal sebagai florotanin terdapat pada tanaman alga. Namun algal polifenol ini mempunyai perbedaan dengan polifenol dari tumbuhan terestrial. Polifenol dari tumbuhan terestrial berasal dari asam galat and asam ellagat, sedangkan algal polifenol berasal dari unit floroglusinol (*1,3,5-trihydroxybenzene*) (Burtin, 2003).

Florotanin terdiri dari molekul dengan struktur dan tingkat polimerisasi yang heterogen yaitu *phloroglucinol* (2 %) dan oligomernya seperti *eckol* (trimer, 3 %), *phlorofucofuroeckol A* (pentamer, 28 %), *dieckol* (hexamer, 7 %), 8,8' – *bieckol* (hexamer, 7 %) dan lainnya (30 %). Florotanin dengan struktur dan tingkat polimerisasi yang heterogen memungkinkan senyawa ini mempunyai aktivitas biologik yang luas (Athukorala *et al.*, 2006; Yuan dan Walsh, 2006; Kang *et al.*, 2005a).



Gambar 1. Struktur molekul floroglusinol

D. Tahap Isolasi Florotanin

1. Ekstraksi

Penyarian adalah kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Faktor yang mempengaruhi kecepatan penyarian adalah kecepatan difusi zat yang larut melalui lapisan batas antara cairan penyari dengan bahan yang mengandung zat tersebut. Penyarian dengan alat sokhlet merupakan penyarian yang menggabungkan dua proses sekaligus, yaitu proses untuk menghasilkan ekstrak cair dan proses penguapan sehingga diperoleh ekstrak yang lebih pekat (Anonim, 1986).

Prinsip penyarian dengan alat sokhlet adalah serbuk simplisia yang dibungkus kertas saring dimasukkan ke dalam tabung. Cairan penyari diisikan pada labu sampai dua kali sirkulasi. Cairan penyari dipanaskan hingga mendidih. Uap cairan penyari akan naik ke atas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Cairan turun ke labu melalui tabung yang berisi serbuk simplisia sambil melarutkan zat aktif. Cairan penyari akan mencapai permukaan *sifon* kemudian akan kembali ke labu. Cara ini

menguntungkan karena uap panas tidak melalui serbuk simplisia, tetapi melalui pipa samping (Anonim, 1986).

Metode sokhletasi mempunyai beberapa keuntungan antara lain, cairan penyari yang dibutuhkan lebih sedikit dan secara langsung hasil yang diperoleh lebih pekat. Serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni maka dapat menyari zat aktif lebih banyak dan penyarian dapat diteruskan tanpa menambah volume cairan penyari (Anonim, 1986).

2. Fraksinasi

Fraksinasi adalah pemisahan ekstrak menjadi kelompok senyawa yang memiliki karakteristik fisikokimia yang sama. Salah satu metode untuk mendapatkan fraksi dapat dilakukan dengan cara ekstraksi pelarut-pelarut (Houghton, 1998).

Pada ekstraksi pelarut-pelarut, terbentuk dua lapisan saat cairan yang satu ditambahkan pada ekstrak yang berada pada cairan lain di mana kedua cairan tersebut tidak saling campur. Komponen apapun dalam campuran akan memiliki kelarutan pada tiap lapisan (pada dua lapisan yang tidak saling campur) dan setelah beberapa saat konsentrasi ekuilibrium pada kedua lapisan tercapai (Houghton, 1998).

E. Metode Kolorimetri dengan Spektrofotometri Visibel

1. Kolorimetri

Kolorimetri adalah suatu teknik pengukuran cahaya yang diabsorpsi oleh zat berwarna baik warna yang terbentuk dari asalnya maupun akibat reaksi dengan zat lain (Khopkar, 1990). Menurut definisi yang diperluas, sebagai kolorimetri juga tercakup perubahan senyawa tidak berwarna menjadi zat yang berwarna dan penentuan fotometrinya dilakukan dalam daerah sinar tampak (400 – 800 nm) (Roth dan Baschke, 1994).

Senyawa yang semula tidak berwarna harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa berwarna karena senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tampak. Cara yang digunakan adalah dengan mengubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu :

- a) Reaksinya selektif dan sensitif
- b) Reaksinya cepat, kuantitatif, dan reproduisible
- c) Hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama.

Keselektifan dapat dinaikkan dengan mengatur pH, pemakaian *masking agent*, atau penggunaan teknik ekstraksi (Rohman, 2007).

Metode kolorimetri melibatkan perbandingan intensitas warna secara visual artinya warna dari larutan senyawa yang tidak diketahui atau senyawa yang diteliti dibandingkan dengan warna dari satu standar ataupun beberapa seri standar. Perbandingan ini dibuat dengan mencapai kesesuaian antara warna

senyawa yang diteliti dengan standar yang biasanya dibuat dalam tabung Nessler (Butz dan Nobel, 1961).

Menurut Schirmer (1982), ada dua jenis kolorimetri :

a) Metode kolorimetri langsung

Metode kolorimetri dapat digunakan untuk menentukan besarnya senyawa yang dapat menyerap cahaya tampak dengan kuat. Masalah mendasar pada metode ini adalah pemisahan analit dari senyawa lain yang dapat mengganggu. Proses pemisahan dapat dilakukan dengan ekstraksi dan teknik kromatografi. Bahan pengganggu pada metode kolorimetri relatif lebih sedikit daripada pada metode spektrofotometri UV, karena relatif sedikit substansi yang memberikan serapan pada panjang gelombang gelombang visible. Metode ini lebih selektif dibandingkan dengan spektrofotometri UV (Schirmer, 1982).

b) Metode kolorimetri tidak langsung

Pada metode kolorimetri tidak langsung, senyawa yang akan ditetapkan jumlahnya tidak dapat menyerap cahaya tampak secara langsung. Oleh karena itu perlu ditambahkan suatu kromofor ke dalam sampel yang akan dianalisis. Kromofor dapat diberikan pada suatu senyawa kimia dengan menggunakan prosedur yang relatif sederhana. Hal ini menyebabkan metode kolorimetri dengan spektrofotometri visible semakin luas penggunaannya untuk analisis obat. Didukung pula oleh sensitifitas dan presisi yang baik dari spektrofotometer (Schirmer, 1982).

Pemilihan prosedur kolorimetri untuk menentukan substansi tergantung pada pertimbangan sebagai berikut :

- a) metode kolorimetri akan memberikan hasil yang lebih akurat pada konsentrasi rendah dan prosedur yang lebih sederhana daripada titrimetri atau gravimetri.
- b) metode kolorimetri sering digunakan pada kondisi dimana dengan metode titrimetri atau gravimetri memberikan hasil yang tidak memuaskan.
- c) metode kolorimetri memiliki keuntungan dalam menetapkan suatu substansi dari beberapa komponen dalam sejumlah sampel yang sama (Bassett *et al.*, 1994).

Kriteria untuk analisis kolorimetri yang baik adalah :

- a) Menghasilkan reaksi warna yang spesifik

Reaksi yang khas untuk suatu senyawa tertentu sangat sedikit jumlahnya, tetapi kebanyakan reaksi menghasilkan warna untuk sekelompok kecil zat, artinya reaksi-reaksi warna tersebut selektif. Dengan memasukkan senyawa pembentuk kompleks, mengubah keadaan kondisi dan pengendalian pH, dapat mencapai pendekatan kespesifisikan ini.

- b) Adanya proporsi yang sesuai antara warna dan konsentrasi

Untuk kolorimeter visual sangat penting bahwa intensitas warna harus meningkat secara linier dengan konsentrasi dari substansi yang ditentukan.

c) Stabilitas warna

Warna yang dihasilkan harus cukup stabil untuk memungkinkan pembacaan serapan yang tepat dan cermat. Dalam hal ini periode warna maksimum harus cukup panjang.

d) Reprodusibel

Prosedur kolorimetri harus memberikan hasil yang reprodusibel dalam kondisi yang spesifik.

e) Kejernihan larutan

Larutan harus bebas dari pengotor atau endapan jika pembanding yang dipakai berupa standar yang jernih. Kekeruhan akan menyerap dan menghamburkan cahaya.

f) Kepekaan yang tinggi

Hal ini harus diperhatikan terutama jika zat yang diukur kuantitasnya kecil (Bassett *et al.*, 1994).

2. Spektrofotometri Visibel

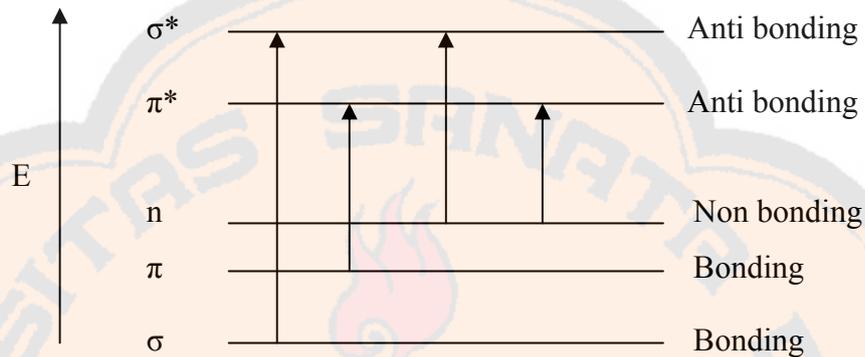
Spektrofotometri visibel adalah analisis spektroskopik yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik sinar tampak (380-780 nm) dengan menggunakan instrumen spektrofotometer. Radiasi elektromagnetik dalam rentang panjang gelombang 380-780 nm merupakan radiasi yang dapat dilihat indera penglihatan manusia sehingga disebut cahaya tampak (*visible*) (Mulja dan Suharman, 1995).

Prinsip kerja spektrofotometri berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan materi (atom, ion, atau molekul). Serapan adalah interaksi yang menyebabkan perpindahan energi dari sinar radiasi ke materi. Serapan atom menyebabkan peralihan elektronik atau transisi elektronik, yaitu peningkatan energi elektron dari tingkat dasar (*ground state*) ke tingkat energi yang lebih tinggi (*excited state*). Transisi ini, terjadi bila energi yang dihasilkan oleh radiasi sama dengan energi yang diperlukan untuk melakukan transisi (Rohman, 2007).

Ada 3 macam distribusi elektron di dalam suatu senyawa organik secara umum, yang dikenal sebagai orbital elektron phi (π), sigma (σ), dan elektron tidak berpasangan (n) (Mulja dan Suharman, 1995). Suatu molekul apabila dikenai radiasi elektromagnetik maka molekul tersebut akan menyerap radiasi elektromagnetik yang energinya sesuai. Interaksi ini meningkatkan energi potensial elektron pada tingkat eksitasi. Apabila pada molekul tadi hanya terjadi transisi elektronik pada satu macam gugus, maka akan terjadi satu serapan yang merupakan garis spektrum.

Pada kenyataannya, spektrum visible yang merupakan korelasi antara serapan (sebagai ordinat) dan panjang gelombang (sebagai absis) tidak merupakan garis spektrum akan tetapi sebagai pita spektrum. Terbentuknya pita spektrum visible tersebut disebabkan transisi energi yang tidak sejenis dan terjadinya

eksitasi elektronik lebih dari satu macam pada gugus molekul yang kompleks (Rohman, 2007).



Gambar 2. Diagram tingkat energi elektronik (Mulja dan Suharman, 1995)

Apabila suatu molekul dikenakan radiasi elektromagnetik maka kemungkinan akan terjadi eksitasi elektron ke tingkat energi yang lebih tinggi yang dikenal sebagai orbital elektron antibonding seperti terlihat pada gambar 2 (Mulja dan Suharman, 1995).

Eksitasi elektron $\sigma \rightarrow \sigma^*$ membutuhkan energi paling besar dan terjadi di daerah ultraviolet jauh yang dihasilkan ikatan tunggal. Eksitasi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dihasilkan ikatan rangkap dua dan tiga juga terjadi apabila molekul menyerap energi di daerah ultraviolet jauh (Mulja dan Suharman, 1995).

Transisi elektronik pada senyawa organik yang dapat terjadi yaitu transisi elektron dari orbital $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, dan $n \rightarrow \pi^*$. Transisi elektronik yang berguna dalam eksperimen adalah transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ karena memberikan spektra di daerah 200-700 nm. Kedua transisi ini,

membutuhkan adanya gugus fungsional yang tidak jenuh sehingga ikatan rangkap akan memberikan orbital phi yang diperlukan (Rohman, 2007).

Penyerapan radiasi oleh senyawa kompleks logam berbeda dengan senyawa organik karena melibatkan perpindahan muatan dari donor elektron ke akseptor elektron yaitu pergerakan elektron dari ion logam ke ligan atau sebaliknya. Spesies-spesies yang menunjukkan penyerapan karena perpindahan muatan sangat penting karena absorptivitas molarnya sangat besar ($\epsilon > 10.000 \text{ liter.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) (Rohman, 2007).

Saat transisi, terjadi reaksi reduksi-oksidasi antara ion logam dan ligan. Biasanya, ion logam tereduksi dan ligan teroksidasi. Ion logam berada pada status oksidasi terendah, dikompleks oleh ligan dengan afinitas elektron tinggi yang dapat teroksidasi tanpa merusak kompleks (Christian, 2004). Kecenderungan perpindahan elektron akan meningkat jika energi radiasi yang dibutuhkan untuk terjadinya proses perpindahan muatan kecil. Kompleks yang dihasilkan akan menyerap pada panjang gelombang yang besar (Rohman, 2007).

Secara eksperimental sangat mudah untuk mengukur banyaknya radiasi yang diserap oleh suatu molekul sebagai fungsi frekuensi radiasi. Suatu grafik yang menghubungkan antara banyaknya sinar yang diserap dengan frekuensi (atau panjang gelombang) sinar merupakan spektrum absorpsi. Transisi yang dibolehkan untuk suatu molekul dengan struktur kimia yang berbeda adalah tidak sama sehingga spektra absorpsinya berbeda. Dengan demikian spektra dapat digunakan sebagai bahan informasi yang bermanfaat untuk analisis kualitatif. Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi, sehingga spektra absorpsi juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif (Rohman, 2007).

Dalam aspek kuantitatif, suatu berkas radiasi dikenakan pada cuplikan (larutan sampel) dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur besarnya. Radiasi yang diserap oleh cuplikan ditentukan dengan membandingkan intensitas sinar yang diteruskan bila spesies penyerap tidak ada dengan intensitas sinar yang diteruskan bila spesies penyerap ada. Intensitas sinar yang diteruskan bila tidak ada spesies penyerap merupakan intensitas sinar yang masuk dikurangi dengan yang hilang oleh penghamburan, pemantulan, dan serapan oleh konstituen lain (Sastrohamidjojo, 1991).

Intensitas sinar yang diteruskan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Alasan dilakukan pengukuran pada panjang gelombang maksimum adalah perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi pada panjang gelombang tersebut paling besar sehingga kepekaan maksimal. Selain itu, pita serapan pada panjang gelombang maksimal datar sehingga memberikan kesalahan yang kecil dalam setiap pengukuran (Mulja dan Suharman, 1995).

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan konsentrasi larutan.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon b c$$

Keterangan =

I_0 = intensitas radiasi yang datang

I = intensitas radiasi yang diteruskan

ϵ = daya serap molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

c = konsentrasi larutan ($mol \cdot L^{-1}$)

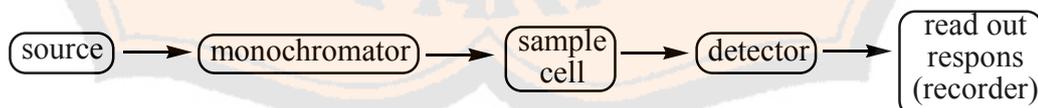
b = panjang sel (cm)

A = serapan (Mulja dan Suharman, 1995)

Dalam hukum Lambert-Beer tersebut ada beberapa pembatasan yaitu :

- ❖ Sinar yang digunakan dianggap monokromatis
- ❖ Penyerapan terjadi dalam suatu volume yang mempunyai penampang luas yang sama.
- ❖ Senyawa yang menyerap dalam larutan tidak tergantung terhadap senyawa lain dalam larutan tersebut.
- ❖ Tidak terjadi peristiwa fluoresensi atau fosforisensi
- ❖ Indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan (Rohman, 2007)

Spektrofotometer adalah suatu instrumen yang akan memisahkan radiasi polikromatis menjadi beberapa panjang gelombang yang berbeda. Instrumentasi dari spektrofotometer adalah : 1) sumber radiasi kontinyu pada λ tertentu, 2) monokromator untuk mendapatkan berkas sempit dari sumber spektrum, 3) sel sampel, 4) detektor, 5) pembaca respon detektor atau *recorder* (Christian, 2004).



Gambar 3. Diagram alir instrumentasi spektrofotometer visibel (Christian, 2004)

F. Metode Folin Ciocalteu

Total senyawa fenolik dapat ditentukan dengan metode Folin Ciocalteu. Metode ini berdasarkan atas reaksi oksidasi-reduksi secara kolorimetri yang mengukur semua senyawa fenolik (Jansson, 2005). Metode ini menetapkan semua senyawa fenolik tanpa mampu membedakan antara asam galat, monomer, dimer, dan senyawa fenolik yang lebih besar. Namun metode ini merupakan metode kuantitatif, sensitif, dan tidak tergantung pada derajat polimerisasi (Anonim, 2001).

Reagen Folin Ciocalteu merupakan larutan asam berwarna kuning yang tersusun atas: 750 ml air, 100 g natrium tungstat, 25 g natrium molibdat, 50 ml asam fosfat 85 %, 100 ml HCl P, 150 g lithium sulfat, dan beberapa tetes brom (Folin, 1944; Singleton dan Rossi, 1965).

Reagen ini mengandung kompleks ion polimerik yang dibentuk dari asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfotungstat. Reagen ini memiliki bentukan umum dengan pusat berupa tetrahedral fosfat (PO_4^{3-}) yang dikelilingi oleh beberapa unit oktahedral asam-oksi molibdenum dimana struktur tungstat dapat disubstitusi dengan mudah oleh molibdenum (Singleton dan Rossi, 1965).

Fenolik + basa + reagen Folin Ciocalteu + panas \rightarrow produk berwarna biru (kompleks Mo-W) (Anonim, 2001).

Reagen ini mengoksidasi fenolat (garam alkali), sehingga fenolat mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks Mo-W. Fenolat hanya ada pada larutan basa tetapi reagen dan produknya tidak stabil pada kondisi basa.

Reaksi tersebut menghasilkan warna biru ungu yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (Jansoon, 2005).

G. Kesalahan dalam Metode Analisis

Kesalahan dalam metode analisis sangat sukar untuk dihilangkan namun sumber kesalahan tetap harus ditekan seminimal mungkin. Kesalahan dalam analisis kimia dapat dikategorikan menjadi 2 kelas utama, yaitu:

1. Kesalahan Sistematis (*determinate errors*)

Kesalahan sistematis adalah hasil analisis yang menyimpang secara tetap dari harga kadar yang sebenarnya karena proses pelaksanaan prosedur analisis, sehingga kesalahan ini disebut juga kesalahan prosedur (Mulja dan Suharman, 1995). Kesalahan sistematis dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain:

a. Kesalahan personil dan operasi

Kesalahan ini disebabkan oleh cara pelaksanaan analisis, bukan karena metode. Kesalahan operasi umumnya bersifat fisis (bukan khemis), misalnya kesalahan pengamatan visual pada titik akhir titrasi, kekeliruan cara pencucian endapan, dan sebagainya. Jadi kesalahan ini bersifat individual dan sangat dipengaruhi oleh keterampilan analis dalam melakukan pekerjaan analisis.

b. Kesalahan alat dan pereaksi

Kesalahan ini disebabkan oleh pereaksi yang kurang murni, alat yang kurang valid atau pemakaian alat yang kurang tepat walaupun

alatnya sendiri baik, contohnya pengambilan volume tepat dengan pipet ukur atau gelas ukur, penggunaan buret 50 ml (buret makro) untuk analisis mikro, dan sebagainya.

c. Kesalahan metode analisis

Kesalahan ini dapat disebabkan oleh kesalahan pengambilan sampel, kesalahan akibat reaksi kimia yang tidak sempurna, atau ikut mengendapnya zat-zat yang tidak diinginkan.

Kesalahan sistematis dapat dihindari atau diperkecil dengan:

- 1). Mengkalibrasi instrumen dan melakukan koreksi secara berkala (biasanya tiap 3 bulan atau disesuaikan dengan frekuensi pemakaian alat).
- 2). Memilih metode dan prosedur standar dari badan resmi.
- 3). Memakai bahan kimia dengan derajat untuk analisis (*pro analysis* = p.a).
- 4). Meningkatkan pengetahuan dan keterampilan para analis.
- 5). Melakukan penetapan blangko atau kontrol dengan zat baku.
- 6). Melakukan penetapan paralel (*in duplo* atau *in triplo*) (Mulja dan Suharman, 1995; Rohman, 2007).

2. Kesalahan Tidak Sistematis (*indeterminate errors*)

Kesalahan tidak sistematis adalah penyimpangan yang tidak tetap dari hasil penentuan kadar dengan instrumen yang disebabkan fluktuasi dari instrumen yang dipakai (derau). Penyebab kesalahan ini tidak dapat ditentukan dan tidak dapat dikontrol maka kesalahan ini disebut juga kesalahan acak (*random error*). (Mulja dan Suharman, 1995).

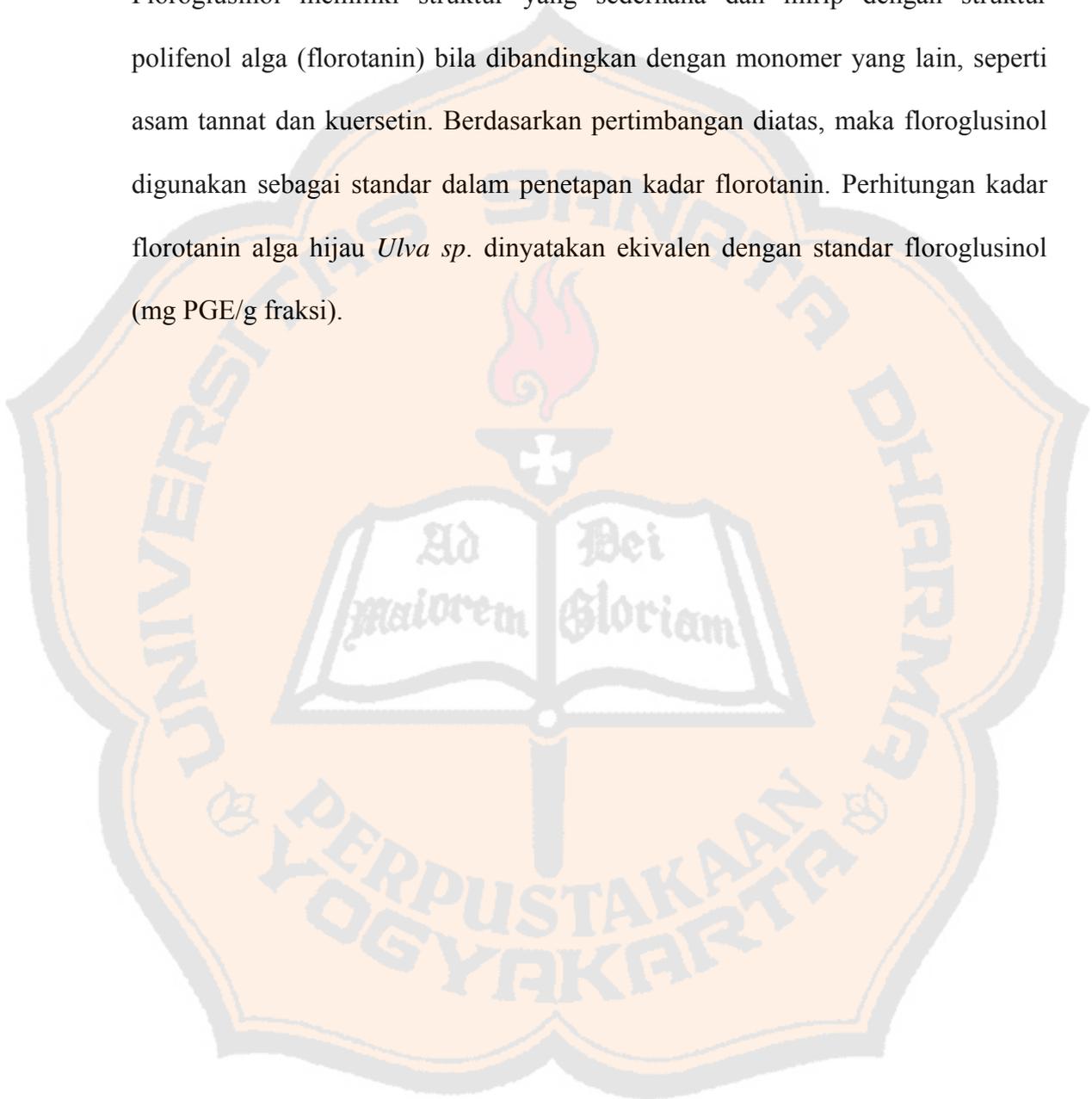
I. Keterangan Empiris

Dalam alga hijau *Ulva sp.* terdapat senyawa polifenol alga atau florotanin. Kandungan polifenol dalam alga hijau *Ulva sp.* dapat dibuktikan secara kualitatif dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 . Apabila terdapat polifenol didalam alga, maka filtrat serbuk alga akan bereaksi positif membentuk kompleks antara ion Fe^{3+} dan gugus-gugus fenol yang berwarna coklat kehijauan.

Polifenol alga dapat diekstraksi dengan cara maserasi maupun sokhletasi menggunakan pelarut metanol. Kerugian metode maserasi adalah waktu ekstraksi yang lama dan penyariannya kurang sempurna. Metode sokhletasi lebih menguntungkan karena proses ekstraksi lebih efisien dengan penggunaan panas dan ekstraksi dilakukan secara berkesinambungan sampai cairan penyari jernih sehingga cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan secara langsung hasil yang diperoleh lebih pekat. Metode sokhletasi dapat digunakan karena dilihat dari sifat fisika-kimia monomer florotanin yaitu floroglusinol cukup stabil terhadap pemanasan hingga suhu $170\text{ }^\circ\text{C}$.

Penetapan kadar florotanin dilakukan secara spektrofotometri dengan metode Folin Ciocalteu. Metode Folin Ciocalteu digunakan untuk menetapkan konsentrasi gugus-gugus hidroksil fenolik dalam sampel. Metode ini tidak menyediakan data senyawa fenolik tertentu dalam ekstrak. Metode Folin Ciocalteu berdasar atas kemampuan mereduksi gugus hidroksil fenolik sehingga tidak spesifik namun sangat sensitif untuk mendeteksi semua kandungan senyawa polifenol dalam fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.*

Blunt *et al.* (2005) telah mengidentifikasi struktur dari beberapa polifenol alga. Salah satu monomer dari polifenol alga tersebut adalah floroglusinol. Floroglusinol memiliki struktur yang sederhana dan mirip dengan struktur polifenol alga (florotanin) bila dibandingkan dengan monomer yang lain, seperti asam tannat dan kuersetin. Berdasarkan pertimbangan di atas, maka floroglusinol digunakan sebagai standar dalam penetapan kadar florotanin. Perhitungan kadar florotanin alga hijau *Ulva sp.* dinyatakan ekuivalen dengan standar floroglusinol (mg PGE/g fraksi).



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian deskriptif non-eksperimental karena tidak ada intervensi atau perlakuan terhadap fenomena yang diamati dan pengamatan fenomena berdasarkan pada keadaan sebenarnya, bukan berdasarkan pada argumen peneliti.

B. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel pengacau terkendali dalam penelitian ini adalah volume cairan penyari untuk mengisolasi florotanin alga hijau *Ulva sp.*, tempat panen alga hijau di pantai Drini, masa panen pada bulan Mei, komposisi reagen saat analisis.
- b. Variabel pengacau tak terkendali dalam penelitian ini adalah umur alga yang dipanen (sampel alga hijau bukan merupakan tanaman budidaya), suhu dan kelembaban ruangan saat percobaan.

2. Definisi Operasional

- a. *Ulva sp.* adalah genus dari alga hijau yang diambil dari pantai Drini, Gunung Kidul, Yogyakarta pada bulan Mei dengan ciri spesifik berupa

- b. pigmen dalam *thallus* alga berwarna hijau tua, helai daun tipis, struktur halus seperti sutra dengan bagian pinggir yang bergelombang.
- c. Ekstrak metanol adalah hasil ekstraksi serbuk alga hijau *Ulva sp.* dengan sokhlet menggunakan pelarut metanol sampai jernih.
- d. Kadar florotanin adalah konsentrasi polifenol total dalam alga, dihitung ekuivalen dengan floroglusinol (mg PGE/g fraksi) yang diukur pada panjang gelombang maksimum 750,1 nm mendekati panjang gelombang maksimum teoritis hasil penelitian Zhang *et al.* dengan metode Folin Ciocalteu.

C. Bahan atau Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut: Alga hijau (*Ulva sp.*) yang diambil dari pantai Drini, Gunung Kidul, Yogyakarta pada tanggal 21 Mei 2007. Metanol, kloroform, etil asetat, aseton, natrium karbonat, floroglusinol (p.a., *E. Merck, Germany*), reagen Folin Ciocalteu (*Sigma Chem, Co., USA.*), dan akuades (Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma).

D. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut: Seperangkat spektrofotometer UV-VIS Perkin Elmer Lambda 20, timbangan elektrik BP 160 dan *scaltec* SBC 22 *readability* 0,01 mg, autoklaf Sanshenyiliaogixie YX-400Z, oven Memmert ULM 500, UM 400, U 50 dan Termaks seri 88725, mesin *blender* Retsch bv, seperangkat alat titrasi Karl Fischer Mettler DL-18, *vaccum rotary evaporator* (Buchi), *waterbath* (Abo-tech), mikropipet 100-1000 μ l (Acura 825, Socorex), tabung reaksi bertutup (*Scott-Germany*), alat-alat untuk sokhletasi, yaitu sokhlet, labu alas bulat (Schott Duran, Germany), *heating mantle*, alat sentrifus, corong pisah 500 ml, *homogenizer* (Vortex Genie), dan alat-alat gelas yang lazim digunakan untuk penelitian di laboratorium analisis (*Pyrex, Germany*)

E. Tata Cara Penelitian

1. Preparasi Sampel Alga hijau *Ulva sp.*

Alga hijau *Ulva sp.* dikumpulkan, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sedimen dan epifit yang menempel, kemudian dimasukkan dalam autoklaf selama 30 menit pada suhu 100 °C. Selanjutnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 80-100 °C selama 6 hari sampai dapat dihancurkan dengan tangan, diserbuk dengan blender, diayak dan dipilih serbuk yang lolos dengan derajat halus 20/30.

2. Penetapan Kadar Air Serbuk Alga Hijau *Ulva sp.*

Penetapan kadar air serbuk alga dilakukan dengan menggunakan metode Karl Fischer. Serbuk alga ditimbang dengan seksama sebesar 1 gram, kemudian ditambah 10 ml metanol, didiamkan selama 1 hari pada suhu kamar. Dilakukan pre-titrasi pada alat, lalu dilakukan uji kebocoran sesuai prosedur perintah pada alat, hingga didapat angka *drift* 10-50 pada alat. Standardisasi dilakukan dengan cara *sput* berisi air ditimbang, kemudian dimasukkan 1 tetes air ke dalam alat. Lalu ditimbang kembali untuk menentukan berat air yang dimasukkan. Kemudian dihitung kesetaraan air. Sebanyak 1 ml metanol dimasukkan dan titrasi dengan alat (blanko). Kemudian 1 ml sampel dimasukkan, titrasi dengan alat, hitung kadar air dalam sampel. Kadar air dalam sampel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{x - \text{blanko} (10)}{\text{berat yang ditimbang}} \times 100 \%$$

x = angka yang muncul pada alat (%), berat yang ditimbang = mg.

3. Screening Fitokimia Alga Hijau

a. Preparasi ekstrak

Tiga puluh ml metanol 80 % ditambahkan pada 10 g serbuk alga hijau *Ulva sp.* dengan derajat halus 20/30. Lalu dimasukkan ke dalam wadah dan dipanaskan pada *waterbath* selama \pm 1 jam. Campuran didinginkan pada suhu ruang, disaring menggunakan corong dan kertas saring, kemudian ditambahkan 5 ml metanol 80 % dan disaring menggunakan corong dan kertas saring (Fong *et al.*, 1992).

b. Uji tanin dan polifenol

Sejumlah volume yang setara dengan 10 g ekstrak metanol 80 % yang telah disiapkan sebelumnya pada langkah preparasi ekstrak, diuapkan menggunakan *waterbath*, ditambahkan 25 ml akuades panas dan dicampur secara merata. Campuran dibiarkan hingga dingin pada suhu kamar, lalu ditambahkan 3-4 tetes larutan NaCl 10 %. Ekstrak disaring dengan menggunakan *vacuum*. Filtrat dibagi ke dalam 4 tabung masing-masing 3 ml. Pada tabung I ditambahkan 4-5 tetes larutan gelatin 1 %. Pada tabung II ditambahkan 4-5 tetes pereaksi garam gelatin (gelatin 1 % ditambahkan NaCl 10 %). Pada tabung III ditambahkan 3-4 tetes ferri klorida (FeCl_3) LP. Tabung IV dijadikan kontrol dan tidak ditambahkan pereaksi apapun. Diamati warna yang terbentuk pada setiap tabung (Fong *et al.*, 1992).

4. Isolasi Florotanin pada Alga Hijau *Ulva sp.*

Serbuk alga ditimbang sebanyak 40 g. Kemudian serbuk dimasukkan ke dalam kantong sokhlet dan dimasukkan dalam labu sokhlet. Setelah itu diberi pelarut metanol sebanyak 2 kali sirkulasi (1 sirkulasi = 70 ml) dalam tabung sokhlet. Proses sokhletasi dilakukan sampai tetesan pelarut jernih dengan suhu 100-120 °C. Setelah selesai, hasil sokhletasi diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sampai volume yang kecil (1/10 dari volume mula-mula) dan ditambahkan kembali pelarut metanol hingga diperoleh 60 ml ekstrak metanol, kemudian ditambahkan 120 ml kloroform, dan 45 ml akuades dalam corong pisah. Corong pisah digojog perlahan dan didiamkan

hingga memisah dan membentuk 2 lapisan. Lapisan atas dan lapisan bawah yang terbentuk dipisahkan, selanjutnya lapisan atas diekstraksi dalam corong pisah dengan etil asetat 75 ml. Ditambahkan 5 ml akuades. Terbentuk dua lapisan, lapisan atas (1) dan lapisan bawah. Lapisan bawah diekstraksi kembali dengan etil asetat 75 ml. Ditambahkan kembali 5 ml akuades. Terbentuk dua lapisan kembali yaitu lapisan atas (2) dan lapisan bawah. Kumpulkan fraksi etil asetat yaitu lapisan atas (1) dan (2), selanjutnya diuapkan, dan diperoleh ekstrak yang merupakan florotanin.

5. Optimasi Metode Kolorimetri dengan Folin Ciocalteu

a. Pembuatan larutan uji dan larutan standar

i. Pembuatan larutan intermediet floroglusinol

Ditimbang dengan cara seksama 0,05 g standar floroglusinol, kemudian dilarutkan ke dalam aseton 75 % sampai volume 50,0 ml. Buat seri konsentrasi (0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; dan 0,06) ppm sebanyak 10,0 ml menggunakan pelarut aseton 75 %.

ii. Perlakuan fraksi etil asetat alga hijau

Ditimbang dengan cara seksama 0,05 g fraksi polifenol, kemudian dilarutkan ke dalam aseton 75 % hingga volumenya 50,0 ml.

b. Penentuan *Operating Time* (OT)

Pipet 0,5 ml larutan intermediet 0,04 ppm dan dimasukkan ke dalam labu takar 50,0 ml yang mengandung 2,5 ml pereaksi fenol Folin Ciocalteu yang

telah diencerkan dengan akuades 1:1. Didiamkan selama 2 menit, kemudian ditambahkan 7,5 ml Na_2CO_3 1,9 M, dicampurkan sampai volume 50,0 ml dengan akuades. *Operating Time* diukur dengan spektrofotometer visibel. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang teoritis hasil reaksi floroglusinol dengan reagen Folin Ciocalteau (750 nm).

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks})

Pipet 0,5 ml larutan intermediet (0,01; 0,03; dan 0,06) ppm dan masukkan ke dalam labu takar 50,0 ml yang mengandung 2,5 ml pereaksi fenol Folin Ciocalteau yang telah diencerkan dengan akuades 1:1. Didiamkan selama 2 menit, kemudian ditambahkan 7,5 ml Na_2CO_3 1,9 M, dicampurkan sampai volume 50,0 ml dengan akuades. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama OT (pada 15 menit pertama dan 15 menit kedua, campuran tersebut divortex selama 30 detik). Kemudian campuran reaksi disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Kemudian ketiga larutan tersebut di-*scanning* pada rentang panjang gelombang 400-900 nm dengan spektrofotometer visibel untuk melihat panjang gelombang maksimumnya.

6. Estimasi Kadar Polifenol Total dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau *Ulva* sp.

a. Perlakuan pada larutan standar floroglusinol

Pipet 0,5 ml untuk masing-masing larutan intermediet dan masukkan ke dalam labu takar 50,0 ml yang mengandung 2,5 ml pereaksi fenol Folin

Ciocalteau yang telah diencerkan dengan akuades 1:1. Didiamkan selama 2 menit, kemudian ditambahkan 7,5 ml Na_2CO_3 1,9 M, dicampurkan sampai volume 50,0 ml dengan akuades. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama OT untuk menyempurnakan reaksi sampai terbentuk warna biru (pada 15 menit pertama dan 15 menit kedua, campuran tersebut divortex selama 30 detik). Kemudian campuran reaksi disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum hasil *scanning* (λ_{maks}) menggunakan spektrofotometer visibel.

b. Perlakuan fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.*

Pipet 5,0 ml larutan sampel alga hijau dan dimasukkan ke dalam labu takar 50,0 ml yang mengandung 2,5 ml pereaksi fenol Folin Ciocalteau yang telah diencerkan dengan akuades 1:1. Didiamkan selama 2 menit, kemudian ditambahkan 7,5 ml Na_2CO_3 1,9 M, dicampurkan sampai volume 50,0 ml dengan akuades. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama OT jam untuk menyempurnakan reaksi sampai terbentuk warna biru (pada 15 menit pertama dan 15 menit kedua, campuran tersebut divortex selama 30 detik). Kemudian, campuran reaksi disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum hasil *scanning* (λ_{maks}) menggunakan spektrofotometer visibel. Konsentrasi polifenol total dihitung ekivalen dengan floroglusinol (mg PGE/g fraksi). Prosedur ini dilakukan sebanyak

3 kali replikasi dengan masing-masing replikasi ditetapkan sebanyak 2 kali dengan cara 2 kali pipet (duplo).

F. Analisis Hasil

1. Uji Kualitatif untuk Tanin dan Polifenol

Warna hasil reaksi pada uji kualitatif dibandingkan dengan warna zat yang tidak diberi tambahan pereaksi. Perubahan warna yang terjadi menunjukkan adanya konstituen fenolik dan sebaliknya, bila tidak ada reaksi dengan larutan FeCl_3 maka tidak ada senyawa tanin maupun senyawa fenolik. Apabila terbentuk warna hijau kebiruan atau hitam kehijauan setelah penambahan larutan FeCl_3 (diasumsikan terbentuk endapan setelah penambahan garam gelatin) maka terdapat senyawa tanin tipe katekol, sedangkan jika terbentuk warna hitam kebiruan setelah penambahan larutan FeCl_3 (diasumsikan terjadi endapan setelah penambahan garam gelatin) maka terdapat senyawa tanin tipe pirogallol. Apabila tidak ada endapan tetapi terjadi perubahan warna menjadi kehijauan atau hitam kebiruan maka tidak terdapat senyawa tanin (Fong *et al.*, 1992).

2. Penetapan Kadar Florotanin dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau *Ulva sp.* Menggunakan Metode Folin Ciocalteu

Hasil berupa kadar dihitung dengan memasukkan absorbansi sampel ke persamaan kurva baku floroglusinol $y = bx + a$. Konsentrasi polifenol total dihitung ekuivalen dengan floroglusinol (mg PGE/g fraksi)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Preparasi Sampel Alga Hijau *Ulva sp.*

Sampel alga hijau didapatkan di perairan dangkal pantai Drini, Gunung Kidul, Yogyakarta pada tanggal 21 Mei 2007. Secara geografis, pantai Drini berada di pantai selatan pulau Jawa, wilayah Samudera Indonesia. Suhu perairan habitat laut alga sekitar 27-30 °C.

Alga hijau yang didapat diidentifikasi di Laboratorium Farmakognosi Fitokimia (Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta). Hasil identifikasi yaitu sampel alga hijau termasuk dalam ordo *Ulvales*, familia *Ulvaceae*, genus *Ulva*, (Lampiran 1).

Preparasi sampel alga hijau *Ulva sp.* dilakukan untuk mendapatkan sampel yang layak dan meminimalkan cecaran yang terkandung didalamnya. Langkah preparasi yang dilakukan antara lain penyucian alga, sortasi, autoklaf, pengeringan, penyerbukan, dan penetapan kadar air.

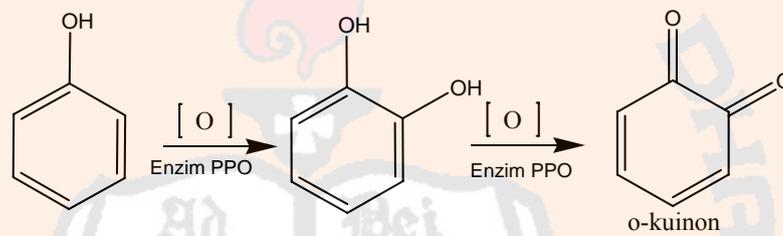
Pencucian alga hijau dilakukan dengan air mengalir sebanyak dua kali untuk menghilangkan kotoran, berupa debu, pasir (silikat), epifit, sedimen, zat kapur, dan material laut yang bukan berasal dari alga hijau yang ikut terbawa dan menempel pada permukaan alga. Menurut Auterhoff dan Knabe (1978), adanya silikat dapat membentuk kompleks molibdat $H_6[SiMo_{12}O_{40}] \cdot n H_2O$ dengan pereaksi Folin Ciocalteu dalam suasana asam, sehingga bila tidak dihilangkan akan mengganggu analisis sampel.

Tanaman laut alga tumbuh dalam suatu populasi biota laut yang terdiri atas berbagai jenis alga (alga hijau, alga coklat dan alga merah). Untuk mendapatkan sampel alga hijau maka perlu dilakukan langkah sortasi. Tujuan dari proses sortasi adalah agar alga jenis lain tidak tercampur dengan sampel alga hijau dan untuk meminimalkan keberadaan materi organik asing (*organic dust*) dan anorganik asing yang dapat mengganggu hasil analisis.

Alga hijau dipisahkan dengan alga jenis lain berdasarkan ciri-ciri morfologisnya. Bagian akar dari alga hijau dihilangkan dengan menggunakan gunting karena alga berakar pada suatu karang sehingga bagian akar dibuang agar materi asing dari batu karang tidak mengganggu hasil analisis. Pada bagian *thallus* alga, terdapat senyawa kalsium yang berupa butiran kapur berwarna putih. Kalsium ini merupakan produk alamiah hasil kalsifikasi dari alga hijau. Dalam suasana basa, kalsium dapat mengakibatkan terbentuknya endapan berupa kalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) setelah bereaksi dengan reagen Folin. Endapan yang terbentuk dapat mengganggu proses analisis.

Materi organik asing dapat ikut mereduksi kompleks asam dalam reagen Folin Ciocalteu sehingga akan mempengaruhi warna larutan sampel yang dihasilkan (membentuk warna hijau-biru). Namun hal ini tidak akan mempengaruhi hasil analisis, karena adanya kandungan bromin dalam reagen Folin Ciocalteu yang berfungsi sebagai *stabilizer*. Kandungan bromin dapat menghilangkan hasil reduksi ini, sehingga tidak lagi membentuk warna kehijauan (Hsien Wu, 1920).

Alga hijau mengandung enzim polifenol oksidase atau *Polyphenol oxydase* (PPO) yang berperan untuk mengkatalisis proses hidroksilasi dari monofenol menjadi *o*-difenol. Selanjutnya, dapat mengkatalisis oksidasi *o*-difenol untuk membentuk *o*-kuinon. Senyawa *o*-kuinon akan mengalami proses polimerisasi dengan cepat dan menghasilkan pigmen berupa senyawa polimer polifenol yang panjang. Proses oksidasi fenol oleh enzim polifenol oksidase digambarkan pada gambar dibawah ini (Sullivan *et al*, 2003).



Gambar 4. Proses oksidasi fenol oleh enzim polifenol oksidase

Proses polimerisasi senyawa polifenol yang dikatalis oleh enzim PPO harus dihentikan untuk menghindari terbentuknya pigmen berupa senyawa dengan rantai polimer polifenol yang panjang. Polifenol dengan rantai polimer yang panjang tidak dapat dikembangkan menjadi bahan aktif sediaan suncreen karena tidak dapat memberikan absorbansi yang maksimal pada panjang gelombang UV tetapi memberikan absorbansi pada panjang gelombang visibel.

Bahan aktif sediaan suncreen harus memberikan serapan maksimal didaerah UV karena radiasi UV dapat menyebabkan iritasi dan kanker kulit sedangkan radiasi sinar visibel tidak berbahaya bagi kulit manusia. Selain itu, rantai polimer polifenol yang terlalu panjang menyebabkan terbentuknya pigmen

sehingga senyawa florotanin menjadi berwarna kecoklatan. Jika senyawa florotanin yang berwarna kecoklatan digunakan sebagai bahan aktif sediaan suncreen maka akan menurunkan estetika dan penerimaan konsumen terhadap sediaan suncreen tersebut.

Menurut Yagar dan Sagioglu (2000), untuk mendenaturasi enzim polifenol oxidase atau *Polyphenol oxydase* (PPO), maka sampel alga hijau dipanaskan pada suhu 100 °C dalam autoklaf selama 30 menit. Enzim PPO yang telah terdenaturasi tidak dapat mengkatalis proses oksidasi fenol membentuk kuinon maka polimerisasi fenol membentuk polimer polifenol yang lebih panjang tidak akan berlangsung.

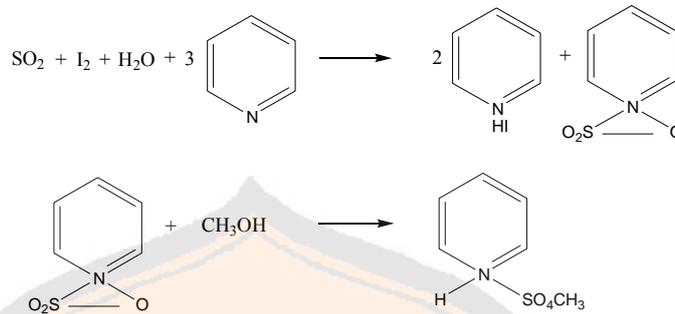
Sampel alga hijau *Ulva sp.* yang telah diautoklaf, disimpan dalam oven bersuhu 80-100 °C selama beberapa hari hingga benar-benar kering. Alga diratakan pada alas kertas koran agar panas yang diterima tiap bagian alga merata. Pengeringan dilakukan sampai didapat tingkat kekeringan tertentu sehingga mudah untuk dihancurkan dengan tangan.

Pengeringan alga bertujuan untuk mencegah tumbuhnya jamur dan mikroba lainnya yang dapat merusak senyawa-senyawa yang terkandung dalam alga dan mempermudah proses penyerbukan dengan blender. Kadar air atau lembab yang semakin rendah menyebabkan sel-sel tanaman alga menjadi lebih rapuh terhadap kekuatan mekanis mesin *blender* sehingga lebih mudah untuk dihaluskan menjadi serbuk. Alga yang telah kering, selanjutnya diserbuk dengan *blender* bermotor sampai didapat partikel serbuk yang cukup halus.

Dari proses penyerbukan dihasilkan serbuk dengan derajat kehalusan yang berbeda-beda. Serbuk yang digunakan sebagai sampel adalah serbuk alga yang lolos pada ayakan 20 mesh dan tidak lolos pada ayakan 30 mesh atau memiliki derajat halus 20/30. Pengayakan bertujuan untuk memperoleh ukuran partikel serbuk yang lebih homogen dan partikel yang tidak terlalu besar atau kecil. Partikel serbuk yang terlalu besar dapat menurunkan efisiensi ekstraksi karena luas area permukaan serbuk alga yang kontak dengan cairan penyari semakin kecil. Partikel serbuk yang terlalu kecil atau halus dapat menyumbat pori-pori filter saat sokhletasi sehingga proses ekstraksi serbuk alga menjadi terhambat.

Penetapan kadar air bertujuan untuk mengontrol kandungan lembab dalam sampel alga hijau. Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2690-1992, salah satu kriteria persyaratan mutu alga kering yang baik adalah kadar air dengan nilai maksimum yang berkisar antara 15-35 %, tergantung pada jenis alga. Kandungan lembab yang terlalu tinggi dapat memicu pertumbuhan mikroba yang mampu menguraikan kandungan organik dalam alga.

Kadar air dari serbuk alga hijau diukur menggunakan metode Karl Fischer. Prinsip metode ini adalah berdasarkan atas reduksi iodine oleh sulfur dioksida dengan adanya air menghasilkan sulfur trioksida. Sulfur trioksida bereaksi dengan metanol menghasilkan garam piridin metil sulfat (Evans, 2002).



Gambar 5. Reaksi pada penetapan kadar air dengan metode Karl Fischer

Kadar air dari serbuk alga hijau yang terukur dengan metode ini adalah replikasi 1 sebesar 6,7 %, replikasi 2 sebesar 5,7 %, dan replikasi 3 sebesar 5,4 %. Rata-rata kadar air alga hijau secara umum adalah $5,9 \pm 0,7$ % b/b. Nilai kadar air yang didapat memenuhi syarat atau dibawah nilai maksimum yang dipersyaratkan oleh SNI yaitu berkisar antara 15-35 %.

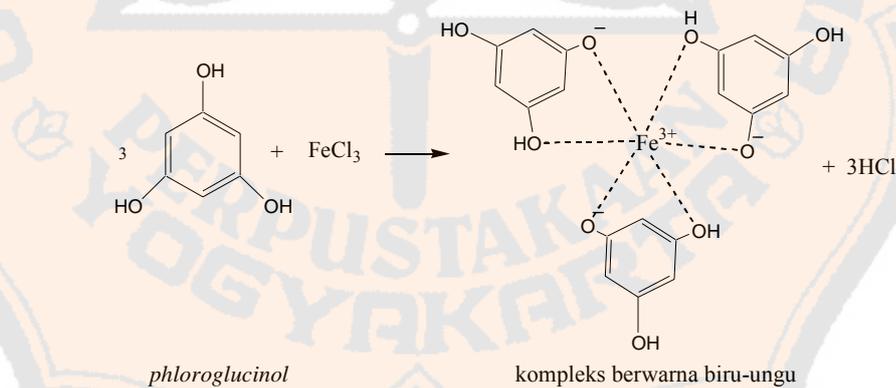
B. Screening Fitokimia Alga Hijau *Ulva sp.*

Tumbuhan menghasilkan bermacam-macam produk sekunder yang mengandung gugus fenol yaitu adanya gugus hidroksil pada cincin aromatik. Senyawa-senyawa tersebut merupakan golongan yang sangat heterogen mulai dari fenol yang sederhana, flavonoid, lignin, dan tanin terkondensasi.

Untuk memastikan adanya senyawa tanin dan polifenol pada alga hijau *Ulva sp.* maka dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan gelatin, garam gelatin dan pereaksi FeCl_3 (ferri klorida). Gelatin merupakan protein yang dapat terdenaturasi oleh tanin. Uji ini dikatakan positif jika timbul endapan gelatin yang terdenaturasi. Penambahan NaCl berfungsi untuk meningkatkan kepekaan reaksi dengan membentuk pH titik isoelektrik dimana pada pH tersebut jumlah muatan positif dan negatif seimbang sehingga tidak ada interfensi muatan dari senyawa

lain yang dapat mendenaturasi gelatin. Filtrat alga yang diberi gelatin 1 % dan garam gelatin menghasilkan warna coklat muda kehijauan dan timbul endapan yang menunjukkan adanya senyawa tanin.

Fokus senyawa yang diteliti adalah senyawa polifenol sehingga uji kualitatif difokuskan dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 . Dari hasil uji serbuk, alga hijau *Ulva sp.* dikatakan mengandung senyawa polifenol karena bereaksi dengan pereaksi FeCl_3 (terjadi perubahan warna membentuk warna coklat tua kehijauan). Hal ini disebabkan oleh terbentuknya kompleks antara logam Fe^{3+} dan gugus fenol yang membentuk warna. Logam Fe^{3+} mampu mengikat enam senyawa fenolik karena logam Fe^{3+} mempunyai dua elektron pada orbital terluar yang membutuhkan enam elektron dari senyawa fenolik untuk membentuk aturan oktet (logam Fe^{3+} akan stabil jika mempunyai delapan elektron pada orbital terluar atau mengikuti konfigurasi elektron terluar gas mulia).



Gambar 6. Reaksi pembentukan kompleks warna gugus fenolik dan FeCl_3

C. Isolasi Florotanin dari Alga Hijau *Ulva sp.*

Serbuk alga kering diekstraksi dengan cara sokhletasi, yaitu salah satu metode ekstraksi pelarut. Metode ekstraksi pelarut merupakan metode isolasi sederhana yang didasarkan pada karakteristik fisik yaitu polaritas. Polifenol alga atau florotanin merupakan senyawa yang relatif polar sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut yang relatif polar seperti metanol.

Metode sokhletasi dipilih karena proses ekstraksi berulang dengan pemanasan pada sokhletasi lebih cepat dan menghasilkan ekstrak lebih banyak dengan jumlah pelarut tertentu dibandingkan metode maserasi. Pertimbangan lainnya yaitu polifenol alga tahan terhadap pemanasan hingga 170 °C, sehingga sokhletasi dapat dilakukan pada suhu 100-120 °C. Proses sokhletasi dilakukan sampai pelarut metanol pengekstraksi jernih untuk memastikan semua senyawa relatif polar dapat ditarik dalam ekstrak metanol. Lama proses sokhletasi adalah 56 jam dengan suhu 120 °C.

Alasan pemilihan pelarut metanol karena metanol memiliki gugus hidroksil yang memungkinkan membentuk ikatan hidrogen intramolekular dengan gugus hidroksil yang ada pada senyawa fenolik sehingga mampu meningkatkan kelarutan senyawa polifenol dalam pelarut metanol (Padda, 2006).

Hasil sokhletasi diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sampai volume yang kecil (diperkirakan 1/10 dari volume mula-mula) agar diperoleh ekstrak yang lebih pekat konsentrasinya untuk mempermudah proses fraksinasi dengan corong pisah. Ekstrak metanol hasil sokhletasi ditambahkan metanol hasil kondensasi *vacuum rotary evaporator* hingga

diperoleh 60 ml ekstrak metanol agar pada setiap replikasi pengentalan ekstrak diperoleh volume larutan yang konstan.

Fraksinasi florotanin dilakukan dengan menggunakan pelarut yang tidak saling campur untuk memperoleh fraksi polifenol yaitu dengan menggunakan air dan kloroform. Terjadi pemisahan 2 lapisan antara lapisan atas dengan berat jenis yang lebih ringan yakni fraksi metanol-air yang dapat membentuk ikatan hidrogen dan lapisan bawah ialah kloroform. Berdasarkan kepolarannya, florotanin akan lebih tertarik pada fraksi metanol-air (lapisan atas) daripada pelarut kloroform (lapisan bawah). Senyawa seperti lipid dan karotenoid akan lebih tertarik pada fraksi kloroform.

Florotanin pada fraksi metanol-air kemudian dipisahkan dari senyawa non-fenolik lainnya menggunakan etil asetat. Saat etil asetat ditambahkan, sampel tidak memisah dan perlu penambahan air agar dapat terpisah dari fraksi metanol-air. Penambahan air berfungsi untuk menarik metanol, sehingga fraksi etil asetat dapat memisah. Berdasarkan berat jenisnya, fraksi etil asetat berada diatas sedangkan fraksi metanol-air berada dibawah. Senyawa-senyawa yang lebih polar dari florotanin akan tertarik ke dalam fraksi metanol-air, sedangkan senyawa florotanin akan tertarik ke dalam fraksi etil asetat.

Penarikan senyawa fenolik dengan etil asetat dilakukan sebanyak dua kali agar semua fraksi florotanin dapat ditarik dengan lebih sempurna karena proses penarikan secara berulang lebih efektif dibandingkan sekali penarikan dengan jumlah pelarut yang sama.

Fraksi etil asetat dikumpulkan. Florotanin didapatkan dengan menguapkan fraksi etil asetat diatas waterbath. Setelah pelarut menguap, fraksi disimpan didalam oven bersuhu 50 °C agar tidak menjadi lembab dan rusak karena terpapar udara bebas yang mengandung uap air. Florotanin yang diperoleh menjadi analit untuk ditetapkan kadar polifenol totalnya dengan menggunakan reagen Folin Ciocalteau.

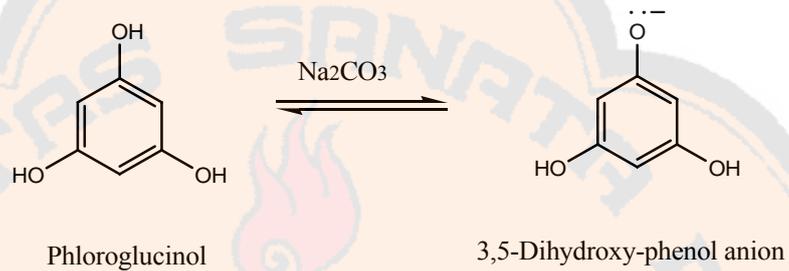
D. Prinsip Reaksi Kolorimetri dengan Folin Ciocalteau

Estimasi konsentrasi polifenol dalam florotanin hasil fraksinasi dilakukan secara kolorimetri menggunakan pereaksi Folin Ciocalteau. Metode Folin Ciocalteau berdasarkan atas reaksi oksidasi-reduksi secara kolorimetri yang mengukur kandungan senyawa fenolik total. Reagen Folin Ciocalteau merupakan reagen pengoksidasi yang berupa larutan asam berwarna kuning. Reagen ini mengandung kompleks ion polimerik yang dibentuk dari asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfotungstat.

Prinsip reaksi antara senyawa fenolik dengan pereaksi Folin Ciocalteau melibatkan reaksi antara ion fenolat dengan kompleks ion polimerik dari asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfotungstat. Reaksi yang terjadi meliputi ionisasi fenol oleh alkali membentuk ion fenolat, reduksi reagen oleh ion fenolat untuk menghasilkan produk berwarna biru dan perusakan produk berwarna biru oleh alkali.

Untuk mendapatkan reaksi perusakan yang cepat, pH dinaikkan sampai level dimana semua fenol telah berubah jadi ion fenolat. Suasana basa saat reaksi

diberikan oleh natrium karbonat (Na_2CO_3) 1,9 M. Dalam suasana basa senyawa fenol akan mudah teroksidasi menjadi ion fenolat dan lebih mudah bereaksi dengan pereaksi Folin Ciocalteu. Jika bagian yang telah terionisasi bereaksi dengan reagen folin maka akan terjadi pergeseran kesetimbangan sehingga akan terbentuk fenolat lebih banyak lagi.



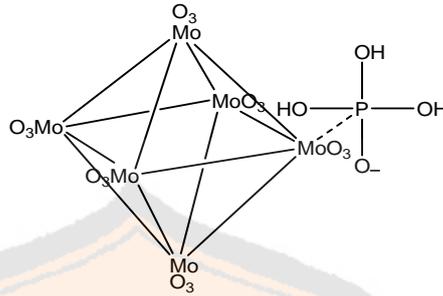
Gambar 7. Kesetimbangan reaksi floroglusinol dalam suasana basa

Reagen Folin Ciocalteu berfungsi sebagai agen pengoksidasi yang akan mengoksidasi ion fenolat. Ion fenolat disini berfungsi sebagai reduktor yang akan mereduksi kompleks asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfatungstat dari reagen Folin Ciocalteu. Saat reaksi terjadi, pereaksi Folin Ciocalteu mendapatkan proton (H^+) dari gugus fenol sampel dan air (tereduksi), sedangkan gugus fenol akan mendapatkan tambahan oksigen dari air dan pereaksi Folin Ciocalteu (teroksidasi). Terjadi kesetimbangan reduksi-oksidasi antara reagen Folin Ciocalteu dan senyawa fenol sebagai analit.

Reaksi Reduksi asam fosfomolibdat:



(Auterhoff dan knabe,1978)



Gambar 9. Kompleks oktahedral-tetrahedral fosfomolibdat

Kompleks *molybdenum-blue* yang terbentuk sukar larut dan membentuk koloidal. Hal ini akan mengganggu pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer. Pada pereaksi Folin Ciocalteu, asam molibdat dicampur dalam bentuk garam NaMolibdat dan ditambah dengan asam fosfat (H_3PO_4), sehingga membentuk kompleks asam fosfomolibdat $(\text{NH}_4)_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Penambahan ini akan mengubah *molybdenum-blue* bentuk koloidal menjadi lebih larut, sehingga dapat dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel. *Molybdenum-blue* bentuk koloidal merupakan larutan yang keruh. Kekeruhan tersebut dapat menyerap dan menghamburkan cahaya.

Warna biru yang dihasilkan setara dengan konsentrasi fenolat yang terbentuk. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak pula ion fenolat yang terbentuk dan reagen Folin Ciocalteu semakin rusak oleh reduktor dan warna biru yang dihasilkan semakin pekat sehingga dapat dianalisis dengan spektrofotometer.

Kondisi basa diperlukan untuk mengoksidasi fenol sehingga menghasilkan ion fenolat, tapi reagen pengoksidasi dan kompleks warna biru yang terbentuk tidak stabil dalam larutan basa. Reagen Folin Ciocalteu harus tetap bertahan dalam suasana basa agar dapat bereaksi dengan semua fenolat, maka dibutuhkan

kondisi optimum berupa reagen fosfo-molibdo-tungstat kadar tinggi dan alkalinitas kadar sedang (Singleton dan Rossi, 1965).

Standart yang digunakan dalam penelitian ini adalah floroglusinol yang merupakan salah satu monomer florotanin. Dari hasil penelitian Zhang *et al.* (2006), ada kesamaan karakteristik antara florotanin dengan baku floroglusinol saat direaksikan dengan reagen Folin Ciocalteu yaitu dari hasil pembacaan panjang gelombang maksimum produk berwarna biru dari metode Folin Ciocalteu pada sampel alga *A. nodosum* dan baku floroglusinol, sama-sama berada pada 750 nm. Larutan floroglusinol digunakan sebagai standar dalam penetapan kadar florotanin, dan kadar florotanin dihitung ekivalen terhadap floroglusinol.

E. Optimasi Metode Kolorimetri dengan Folin Ciocalteu

1. Penentuan *Operating Time* (OT)

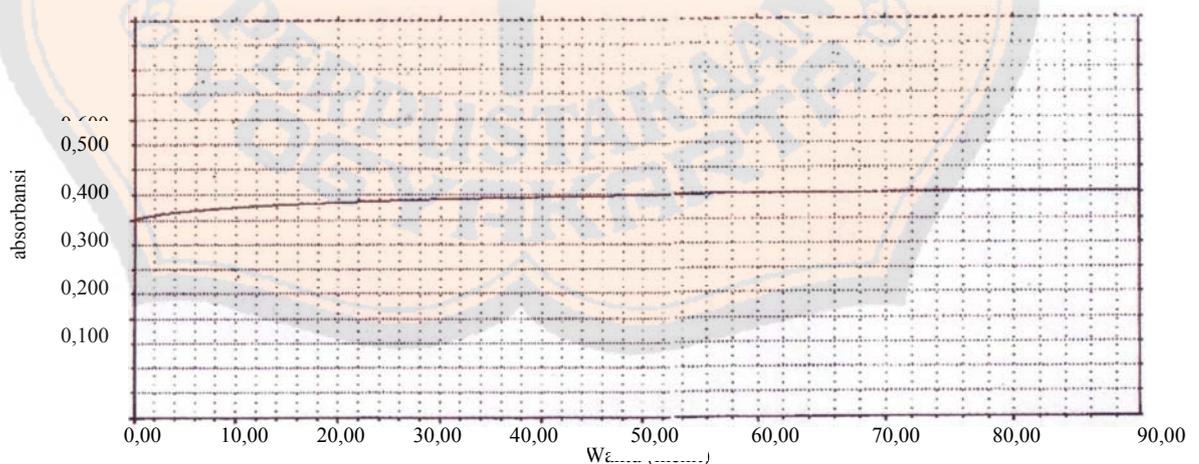
Penentuan *operating time* dilakukan untuk menentukan waktu pengukuran yang menunjukkan hasil pembacaan absorbansi suatu senyawa yang stabil. *Operating time* ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.

Penentuan *operating time* sangat penting dalam pengukuran dengan metode analisis menggunakan prinsip kolorimetri karena warna hasil reaksi yang dihasilkan tidak selamanya stabil. Pada saat awal terjadi reaksi, absorbansi senyawa berwarna akan meningkat sampai waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama waktu pengukuran, maka ada kemungkinan senyawa berwarna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warna

dan absorbansinya akan menurun. Maka untuk pengukuran senyawa berwarna (hasil suatu reaksi kimia) harus dilakukan pada rentang *operating time*.

Pengukuran *operating time* dilakukan pada larutan baku floroglusinol dengan konsentrasi 4,0 ppm, dilakukan pada panjang gelombang teoritis yaitu 750 nm. Penentuan *operating time* ini dilakukan dengan mengukur absorbansi warna yang terbentuk selama 90 menit.

Dari kurva pengukuran *operating time* terlihat bahwa absorbansi warna yang dihasilkan telah stabil dari menit ke-50 sampai menit ke-90 dengan absorbansi 0,454. Kestabilan warna ini menandakan reaksi pembentukan warna sudah optimum sehingga jika pengukuran absorbansi dilakukan pada rentang waktu tersebut dapat meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran. Prosedur pembacaan absorbansi standar dan sampel harus dilakukan pada rentang *operating time* yaitu menit ke 50-90. Hasil pembacaan *operating time* standar floroglusinol adalah sebagai berikut (gambar 7) :



Gambar 10. Hasil pembacaan *operating time* floroglusinol kadar 4,0 ppm yang telah direaksikan dengan pereaksi Folin Ciocalteu

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks})

Penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) merupakan faktor penting di dalam analisis kimia dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Tujuan dari penentuan panjang gelombang maksimum dalam penelitian ini adalah untuk mencari panjang gelombang saat warna yang terbentuk mempunyai absorbansi yang maksimum. Panjang gelombang maksimum ini digunakan untuk mengukur serapan dari larutan yang akan dianalisis.

Panjang gelombang maksimum tidak tergantung pada struktur molekul suatu senyawa tetapi bergantung pada gugus molekul yang mengabsorpsi radiasi sinar UV-Vis sehingga jika ada dua senyawa dengan spektra UV-Vis yang sama, belum tentu kedua senyawa tersebut adalah sama. Hal inilah yang menyebabkan panjang gelombang maksimum digunakan sebagai data sekunder dalam analisis kualitatif (Mulja dan Suharman, 1995).

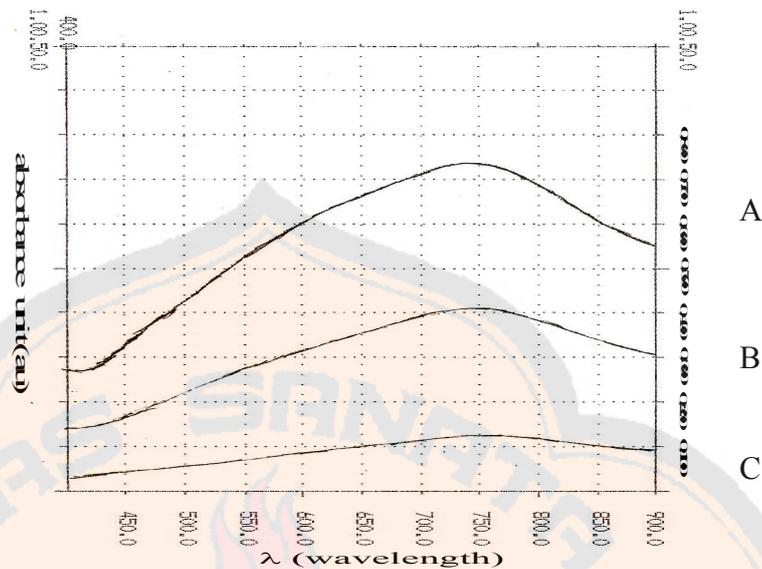
Dalam analisis kuantitatif, pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum karena perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar, sehingga akan diperoleh kepekaan analisis yang maksimum. Selain itu, kurva serapan disekitar panjang gelombang maksimum tersebut relatif datar sehingga pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer akan terpenuhi dan jika dilakukan pengukuran ulang atau replikasi, kemungkinan terjadinya kesalahan yang disebabkan oleh pengukuran ulang menjadi kecil.

Zhang *et al.* (2006) telah melakukan penelitian tentang estimasi kandungan polifenol total pada sampel rumput laut dan ekstraknya berdasarkan

reaksi Folin Ciocalteu secara kolorimetri. Panjang gelombang maksimum untuk standar floroglusinol dan sampel *A. nodosum* ialah 750 nm.

Pada penelitian ini dilakukan verifikasi terhadap panjang gelombang maksimum teoritis karena terdapat beberapa kondisi percobaan yang berbeda antara penelitian ini dengan penelitian yang pernah dilakukan. Perbedaan itu antara lain adalah perbedaan waktu, tempat, iklim, alat-alat yang digunakan, dan individu yang melakukan. Pembacaan λ_{maks} dilakukan pada rentang 400-900 nm agar dapat melihat puncak spektra yang lebih jelas disekitar 750 nm sebagai panjang gelombang teoritis.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan membaca spektrum plot panjang gelombang dan absorbansi senyawa hasil reaksi antara reagen Folin Ciocalteu dengan baku floroglusinol pada kadar kecil 1,0 ppm, kadar tengah 3,0 ppm, kadar terbesar 6,0 ppm dalam seri kurva baku. Hasil yang didapat menunjukkan tiga puncak absorbansi maksimum pada panjang gelombang yang berbeda, yakni pada 1,0 ppm didapat λ_{maks} 758,7 nm; 3,0 ppm didapat λ_{maks} 750,1 nm; dan 6,0 ppm didapat λ_{maks} 743,4 nm (gambar 8).



Gambar 11. Hasil pembacaan λ_{maks} floroglusinol pada tiga konsentrasi (A = 1,0 ppm; B = 3,0 ppm; dan C = 6,0 ppm) setelah direaksikan dengan pereaksi Folin Ciocalteu

Dari hasil pembacaan panjang gelombang maksimum terdapat kecenderungan bahwa semakin besar konsentrasi baku floroglusinol, maka panjang gelombang maksimum cenderung bergeser ke panjang gelombang yang lebih kecil. Ini dimungkinkan oleh sifat ionisasi fenolik menjadi ion fenolat dalam suasana basa hingga membentuk kuinon yang memiliki kromofor sehingga mampu mengabsorpsi radiasi cahaya tampak pada tingkat energi lebih kecil atau panjang gelombang yang lebih besar.

Pada konsentrasi kecil, dengan suasana basa tetap dari Na_2CO_3 1,9 M maka lebih mudah mengoksidasi floroglusinol menghasilkan ion fenolat yang memiliki muatan negatif pada atom oksigen sehingga lebih reaktif untuk berinteraksi dengan cincin benzene daripada pasangan elektron bebas yang ada pada molekul tak terionkan. Hal ini dapat meningkatkan intensitas absorpsi cahaya dan posisi λ_{maks} bergeser ke panjang gelombang yang lebih besar (Cairns, 2005).

Pergeseran panjang gelombang maksimum ini juga dapat dikarenakan terdapat dua bentuk reduksi dari reagen Folin Ciocalteu sehingga senyawa kompleks *molybdenum blue* yang terukur bukan merupakan satu bentuk senyawa namun berupa campuran dari dua bentuk senyawa kompleks *molybdenum blue* dengan rumus struktur yang berbeda.

Hasil pembacaan absorbansi seri baku floroglusinol pada ketiga panjang gelombang didapatkan hasil yang tidak berbeda jauh. Namun dipilih panjang gelombang tengah 750,1 nm karena paling mendekati λ_{maks} teoritis 750 nm, hasil reaksi floroglusinol dengan reagen Folin Ciocalteu (Zhang *et al*, 2006). Sesungguhnya tidak ada panjang gelombang maksimal teoritis yang pasti untuk mengukur sampel florotanin karena florotanin bukan merupakan senyawa tunggal tetapi merupakan campuran senyawa heterogen polimer polifenol dengan unit monomer berupa floroglusinol.

3. Pembuatan Kurva Baku floroglusinol

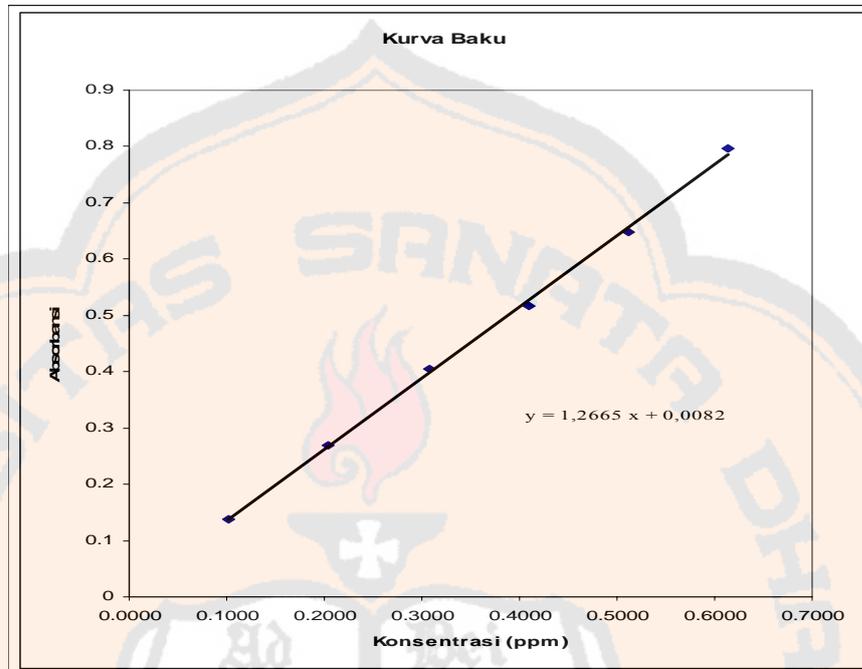
Untuk mendapatkan kurva baku floroglusinol, maka dilakukan pengukuran terhadap baku floroglusinol dengan replikasi sebanyak 3 kali pada panjang gelombang yang dipilih yaitu 750,1 nm. Didapat 3 persamaan kurva baku yang berbeda sebagai berikut:

Tabel I. Data replikasi seri baku floroglusinol

Seri Baku	Replikasi I		Replikasi II		Replikasi III	
	Kadar (mg/100mL)	absorbansi	Kadar (mg/100mL)	absorbansi	Kadar (mg/100mL)	absorbansi
1	0,1024	0,138	0,1046	0,132	0,1008	0,134
2	0,2048	0,269	0,2091	0,257	0,2016	0,255
3	0,3071	0,405	0,3137	0,407	0,3025	0,410
4	0,4095	0,516	0,4182	0,514	0,4033	0,506
5	0,5119	0,648	0,5228	0,643	0,5041	0,636
6	0,6143	0,796	0,6274	0,712	0,6049	0,724
	A	0,0082	A	0,0277	A	0,0253
	B	1,2665	B	1,1381	B	1,1871
	r	0,9994	r	0,9956	r	0,9972

Persamaan kurva baku yang dipilih adalah persamaan kurva baku replikasi I yaitu $y = 1,2665 x + 0,0082$. Persamaan ini dipilih karena nilai r-nya paling mendekati angka 1 dan nilai intersep yang paling kecil. Nilai r yang mendekati angka 1 berarti terdapat korelasi antara konsentrasi dengan absorbansi, bahwa peningkatan konsentrasi floroglusinol akan diikuti dengan kenaikan nilai absorbansi warna hasil reaksi secara proporsional. Adanya korelasi antara konsentrasi floroglusinol dan absorbansi pada persamaan kurva baku replikasi I maka kurva baku tersebut dapat digunakan untuk menghitung kadar florotanin sampel alga hijau *Ulva sp.*

Hubungan antara konsentrasi floroglusinol dan nilai absorbansi dari persamaan baku yang dipilih (replikasi I) disajikan pada gambar di bawah ini:



Gambar 12. Kurva baku hubungan kadar dan absorbansi floroglusinol setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteu

F. Estimasi Kadar Florotanin Dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau *Ulva sp.*

Prosedur estimasi dilakukan dengan menimbang seksama fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* sebanyak 0,05 g. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali penimbangan. Penimbangan sebaiknya dilakukan dalam ruangan dengan kelembaban rendah karena fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* memiliki sifat higroskopis. Kelembaban yang terserap oleh sampel akan mempersulit penimbangan. Sampel yang telah ditimbang, dilarutkan dalam aseton 75 % secara bertahap dengan bantuan pemanasan 50 °C. Fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* yang telah larut sempurna berwarna coklat kehijauan dan jernih.

Sampel dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 750,1 nm. Absorbansi yang didapat dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku yang dipilih yaitu $y = 1,2665 x + 0,0082$ maka diperoleh kadar florotanin fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* menggunakan metode Folin Ciocalteu, dengan replikasi sebanyak tiga kali dan masing-masing replikasi dianalisis dengan duplo seperti yang disajikan pada tabel II.

Tabel II. Hasil penetapan kadar sampel fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* dengan metode Folin Ciocalteu

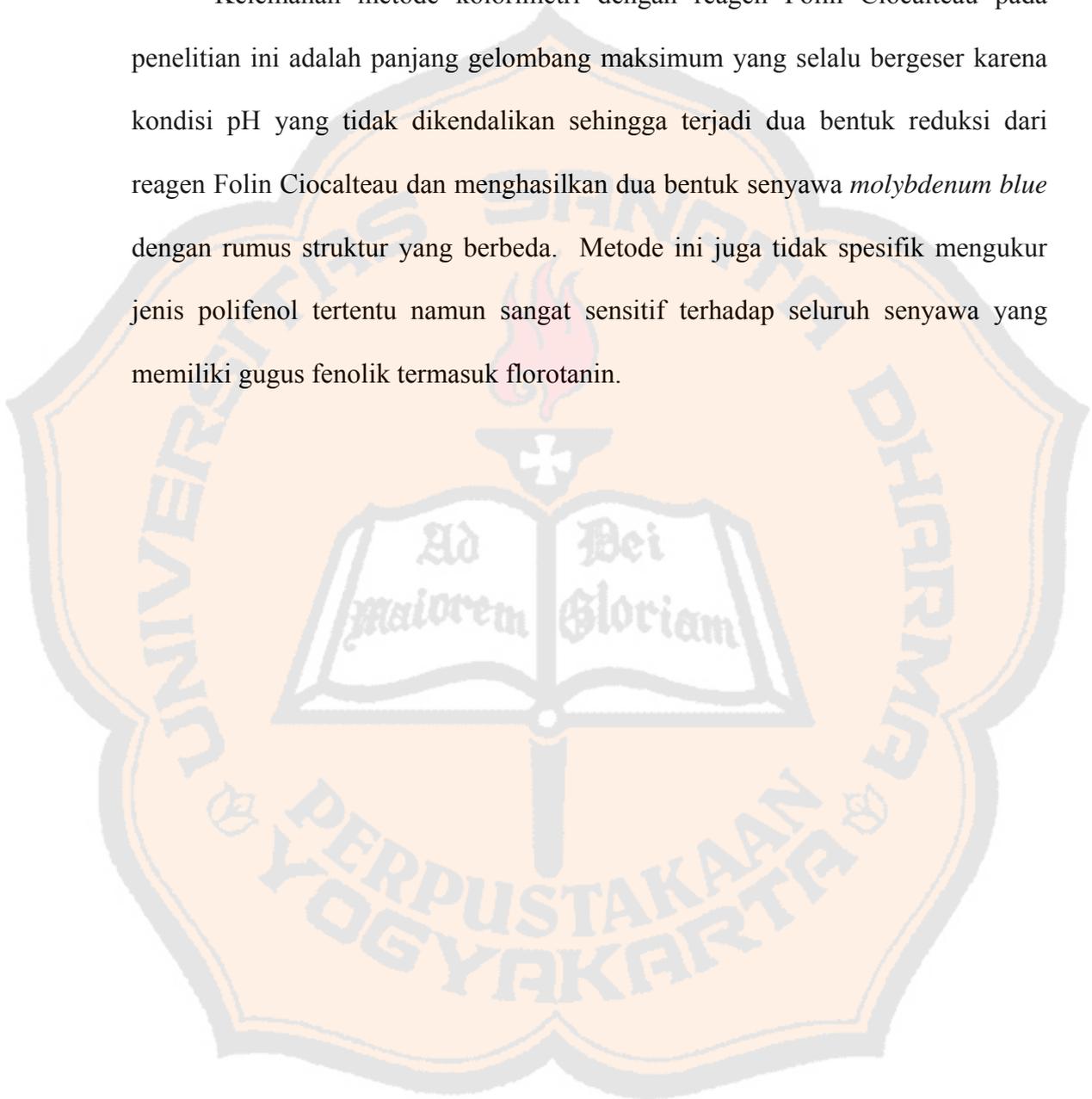
Replikasi (duplo)	Kadar (mg PGE /g)	\bar{X} (mg PGE /g fraksi)
1a	10,76	10,76
1b	10,76	
2a	11,48	10,20
2b	8,91	
3a	11,11	10,92
3b	10,73	

Kadar florotanin dalam fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* yang terukur dengan metode Folin Ciocalteu adalah $10,63 \pm 0,38$ mg PGE/g fraksi. Kadar florotanin yang didapat diestimasi sebagai kadar polifenol total yang ekuivalen dengan standar floroglusinol karena metode Folin Ciocalteu tidak spesifik mengukur jenis polimer polifenol tertentu namun sangat sensitif terhadap seluruh senyawa yang memiliki gugus fenolik termasuk florotanin yang berupa campuran heterogen polifenol dengan tingkat polimer berlainan.

Metode ini memiliki keunggulan dalam hal sensitivitasnya mengukur senyawa-senyawa yang memiliki gugus fenolik hingga tingkat ppm (*part per million*), sederhana karena hanya membutuhkan reagen Folin Ciocalteu dan

kondisi basa ($\text{pH} = 9-10$), dan menghasilkan reaksi warna yang relatif cepat dan stabil dalam rentang waktu yang relatif panjang.

Kelemahan metode kolorimetri dengan reagen Folin Ciocalteu pada penelitian ini adalah panjang gelombang maksimum yang selalu bergeser karena kondisi pH yang tidak dikendalikan sehingga terjadi dua bentuk reduksi dari reagen Folin Ciocalteu dan menghasilkan dua bentuk senyawa *molybdenum blue* dengan rumus struktur yang berbeda. Metode ini juga tidak spesifik mengukur jenis polifenol tertentu namun sangat sensitif terhadap seluruh senyawa yang memiliki gugus fenolik termasuk florotanin.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Florotanin dapat diisolasi dari alga hijau *Ulva sp.* untuk ditetapkan kadarnya dengan metode Folin Ciocalteu.
2. Kadar florotanin dalam fraksi etil asetat alga hijau *Ulva sp.* yang ditetapkan menggunakan metode Folin Ciocalteu adalah $10,63 \pm 0,38$ mg PGE/g fraksi.

B. Saran

1. Perlu dilakukan validasi metode kolorimetri dengan reagen Folin Ciocalteu untuk mengendalikan bentuk senyawa kompleks *molybdenum blue* yang terjadi.

C. Keterbatasan Penelitian

1. Florotanin yang dianalisis adalah florotanin yang terkandung dalam fraksi etil asetat hasil fraksinasi alga hijau *Ulva sp.* yaitu floroglusinol (2 %), dan oligomernya yaitu eckol (trimer, 9 %), florofucofuroeckol A (pentamer, 28 %), dieckol (hexamer, 24 %), dan 8,8'-bieckol (hexamer, 7 %) (Nagayama *et al.*, 2002).
2. Pada penelitian tidak dilakukan pengendalian pH sehingga panjang gelombang maksimum bergeser karena terbentuk dua bentuk reduksi dari reagen Folin

Ciocalteau dan menghasilkan dua bentuk senyawa *molybdenum blue* dengan rumus struktur yang berbeda.

3. Proses penyarian dilakukan dengan metode sokhletasi pada suhu 120 °C selama 56 jam.



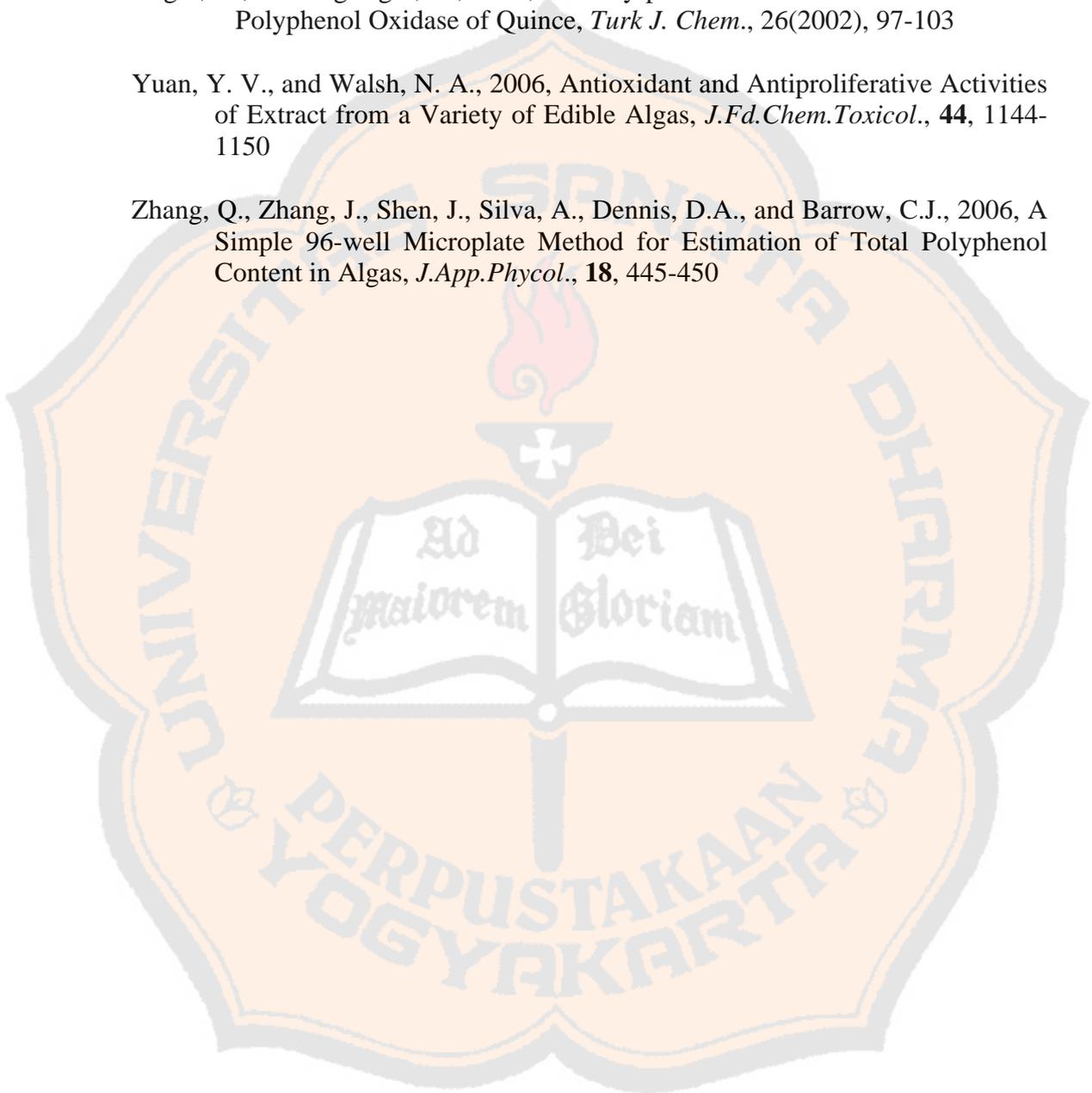
DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, M. J., Yoon, K. D., Min, S.Y., Lee, J. K., Kim, J.H., Kim, T. G., Kim, S.H., Kim, N.G., Huh, H., and Kim, J., 2004, Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by Phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(4), 544-547
- Amin, A., dan Razali, 1997, *Kajian Kepelbagaian dan Taburan Rumpai Laut di Sekitar Desaru, Johor*, Fakulti Sains Hayatuniversiti Kebangsaan Malaysia Bangi, pkukmweb.ukm.my/~ahmad/botani/amin.html ,diakses tanggal 1 November 2007
- Anonim, 1979, *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, Walter de Gruyter, Berlin
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, 11-25, Depkes RI, Jakarta
- Anonim, 2001, *Product Development*, Dry Creek Nutrition, www.activin.com/DCNI Template.htm, diakses pada tanggal 27 Agustus 2007
- Athukorala, Y., Kim, K.N., and Jeon, Y.J., 2006, Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*, *Food Chem.Toxicol.*, **44**(7), 1065-1074
- Auterhoff, H., and Knabe, J., 1978, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, 103, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Mbh., Stuttgart
- Bassett, J., Denney, R. C., Jeffrey, G. H., and Mendham, J., 1994, *Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*, 809-848, Penerbit Buku kedokteran EGC, Jakarta
- Blunt, John W., Brent R. Copp, Murray H. G., Munro, Peter T. Northcote, and Mich`ele R. Prinsep, 2005, *Marine natural products*, DOI: 10.1039/b502792f, *Nat. Prod. Rep.*, **22**, 15
- Burtin, P., 2003, Nutritional Value of Seaweeds, *Electron. J. Environ.Agric.Food Chem.*, **2**(4), 498-503
- Butz, H., and Nobels, H. J., 1961, *Instrumental Methods for the Analysis of Food Additives*, 109-123, Interscience Publisher, New York London
- Cairns, D., 2005, *Essentials of Pharmaceutical Chemistry*, Second Edition, 151-159, Pharmaceutical Press, London
- Christian, G. D., 2004, *Analytical Chemistry*, Sixth Edition, 65, 66, 483,484, John Wiley & Sons, Inc., United States of America

- Dahuri, R., 2003, The Role of Marine Biotechnology in The Development of Marine Biomedical Product, *Proceedings of International Symposium on Biomedicine*, 18-19 September, 2003, 1-5, IPB, Bogor
- De Muth, J.E., 1999, *Basic Statistic and Pharmaceutical Analysis*, 572, 585, Marcel, Dekker, inc., New York, Basel
- Evans, W. C., 2002, *Trease and Evans : Pharmacognosy*, 15th Ed., 98, W.B. Saunders, London
- Folin, Otto, Ciocalteu, Vintila, 1944, *On tyrosine and tryptophane determinations in proteins*, Jour Biol Chem 73: 627-650 1927, cit. Todd-Sanford, 10th ed., 412
- Fong, H. H., Tinwu M., and Farnsworth, N. R., 1992, *Phytochemical Screening*, Departement of Pharmacognosy ang Pharmacology, College of Pharmacy, University of Illinois of the Medical Centre, 803 Southwood, Stract Chicago, Illinois 60162, 32, 62
- Houghton, P.J., 1998, *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*, 7-8, 54, 57, Thomson Science, London
- Hsein Wu, 1920, Contribution to The Chemistry of Phosphomolybdic Acids, Phosphotungstic Acids, And Allied Substances, The Journal of Biological Chemistry ,Harvard Medical School, Boston, 189-220.
- Jansoon, N., 2005, *The Determination of Total Phenolic Compounds in Green Tea*, http://209.85.165.104/search?q=cache:Nj311vjKCdcJ:chemw.sc.mahidol.ac.th/scsess/scch108/2005_06_SCCH108Lab02.pdf+Folin-Ciocalteu+method+colorimetric&hl=en&ct=clnk&cd=9&gl=id, diakses tanggal 24 Oktober 2007
- Kang, K.A., Lee, K.H., Chae, S., Koh, Y.S., Yoo, B.S., Kim, J.H., Ham, Y.M., Baik, J.S., Lee, N.H., and Hyun, J.W., 2005a, Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V-79-4 lung fibroblast against hydrogen peroxide induced cell damaged, *Free Radic. Res.*, **39** (8), 883-892
- Kang, K.A., Lee, K.H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M.S., Ham, Y.M., Baik, J.S., and Hyun, J.W., 2005b, Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damaged via catalase activation, *J.Cell Biochem.*, **97**(3), 609-620
- Khopkar, S.M., 1990, *Basic Concepts of Analytical Chemistry*, alih bahasa oleh Saptoraharjo, A., 193, 204, Universitas Indonesia Press, Jakarta

- Kim, M.M., Ta, Q.V., Mendis, E., Rajapakse, N., Jung, W.K., Byun, H.G., Jeon, Y.J. and Kim, S.K., 2006, Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity, *Life Sci.*, **79**(15), 1436-1443
- Mulja, H.M., Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, 6-11, 19-22, 31-34, 51-58, Airlangga University Press, Surabaya
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, I., Hirayama, I., and Nakamura, T., 2002, Bactericidal Activity of Phlorotannins from The Brown Alga *Ecklonia kurome*, *JAC*, **50**, 889-893
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., and Tanaka, R., 1996 , Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis* , *Fisheries Science*, **62**(6), 923-926
- Padda, 2006, Phenolic Composition And Antioxidant Activity of Sweetpotatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam], *Disertasi*, Punjab Agricultural University ,15
- Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Belajar, Yogyakarta
- Roth, H.J., and Blaschke, G., 1994, *Pharmaceutical Analysis*, diterjemahkan oleh Sarjoko Kisman dan Slamet Ibrahim, 359-361, 373, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Sastrohamidjojo, H., 1991, *Spektroskopi*, Liberty, Yogyakarta, 1-15
- Schirmer, R.E., 1982, *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 75-76
- Shin, H.C., Hwang, H.J., Kang, K.J., and Lee, B.H., 2006, An oxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*, *Arch. Pharm. Res.*, **29**(2), 165-171
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A., 1965, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent, *Am. J. Enol. Vitic*, **16**, 144-158
- Sulistiyowati, H., 1992, *Komposisi dan Distribusi seaweed di pantai Pasir Putih, Kabupaten Situbondo (Laporan Penelitian)*, FKIP-UNEJ, Jember
- Sullivan, M., Thoma, S., Samac, D., and Hatfield, R., 2003, Cloning of Red Clover and Alfalfa Polyphenol Oxydase Genes and Expression of Active Enzymes in Transgenic Alfalfa, *Molecular Breeding of Forage and Turf*, 190

- Svobodova, A., Psotova, J., and Walterova, D., 2003, Natural phenolics in prevention of UV-Induced Skin Damage (A Review), *Biomed. Papers*, **147**(2), 137-145
- Yagar, H., and Sagiroglu, A., 2000, Partially purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince, *Turk J. Chem.*, 26(2002), 97-103
- Yuan, Y. V., and Walsh, N. A., 2006, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Extract from a Variety of Edible Algas, *J.Fd.Chem.Toxicol.*, **44**, 1144-1150
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D.A., and Barrow, C.J., 2006, A Simple 96-well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Algas, *J.App.Phycol.*, **18**, 445-450



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi genus alga



FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA

(KAMPUS III) Paingan Maguwaharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55281
Telp. (0274) 8833037, 883968, Fax. (0274)886529 – Telegram : SADHAR YOGYA
E-Mail : Farmasi@usd.ac.id

SURAT PENGESAHAN DETERMINASI

No: 422/LKTO/far-USD/ 03 / 08

Laboratorium Kebun Tanaman Obat Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, menyatakan bahwa telah melakukan determinasi terhadap satu contoh tanaman, dengan nama:

Ulva sp.
(Alga Hijau)

Determinasi telah dilakukan secara benar sesuai dengan:

Taylor, W. R., 1972, *Marine Algae of The Eastern Tropical and Subtropical Coasts of The Americas*, The University of Michigan Press, United States of America

Hingga kategori: Genus (marga)

Tanaman tersebut dipakai dalam penelitian:

Penetapan Kadar Florotanin dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau *Ulva sp.*

Oleh : Elisabeth Budi Gunawan
Dari : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

Herbarium disimpan Laboratorium Biologi Umum, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, dengan nomor katalog:

Demikian surat pengesahan determinasi ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagai mana mestinya

Mengesahkan,
Kepala Laboratorium

(Yohanes Dwiatmaka, M.Si.)

Yogyakarta, 1 April 2008

Determinator

(Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M. Si.)

Lampiran 2. Data perhitungan kadar air serbuk alga hijau *Ulva sp.* dengan metode *Karl Fischer*

Serbuk alga	Replikasi	Bobot yang ditimbang (mg)	Hasil/angka yang tertera pada alat (%)	Kadar air (%)	Kadar air rata-rata (%)
<i>Ulva sp.</i>	I	999,9	0,0795	6,66	5,93
	II	999,9	0,0699	5,70	
	III	999,8	0,0671	5,42	

Drift = 37

Standarisasi = 24,859 mg H₂O setara dengan 5 ml titran iodium

Blangko :

Berat air + spuit = 8,3147 g

Berat spuit + sisa air = 8,3025 g

Berat air yang dimasukan = 0,0122 g

Kadar air blangko = 0,0129 %

Berat air blangko = $\frac{0,0129}{100} \times 10000 \times 1mg = 1,29mg$

Keterangan: 10000 adalah angka untuk konversi perhitungan blangko dan sampel agar didapat angka yang mempermudah perhitungan.

Replikasi I:

Berat sampel = 999,9 mg

Angka pada alat = 0,0795 %

$$\text{Berat air sampel} = \frac{0,0795}{100} \times 10000 \times 1\text{mg} = 7,95\text{mg}$$

$$\text{Kadar air sampel} = \frac{(7,95 - 1,29)}{999,9\text{mg}} \times 10 \times 100\% = 6,66\%$$

Replikasi II:

Berat sampel = 999,9 mg

Angka pada alat = 0,0699 %

$$\text{Berat air sampel} = \frac{0,0699}{100} \times 10000 \times 1\text{mg} = 6,99\text{mg}$$

$$\text{Kadar air sampel} = \frac{(6,99 - 1,29)}{999,9} \times 10 \times 100\% = 5,70\%$$

Replikasi III:

Berat sampel = 999,8 mg

Angka pada alat = 0,0671

$$\text{Berat air sampel} = \frac{0,0671}{100} \times 10000 \times 1\text{mg} = 6,71\text{mg}$$

$$\text{Kadar air sampel} = \frac{(6,71 - 1,29)}{999,8} \times 10 \times 100\% = 5,42\%$$

Lampiran 3. Hasil *screening* fitokimia alga hijau *Ulva sp.*

Ekstrak alga + 1 % gelatin → positif (+) jika memberikan endapan

Ekstrak alga + 1 % gelatin + 10 % NaCl → positif (+) jika memberikan endapan

Ekstrak alga + FeCl₃ → positif (+) jika berwarna kebiruan atau hitam kehijauan

Ekstrak	Ekstrak + 1 % gelatin	Ekstrak + 1 % gelatin + 10 % NaCl	Ekstrak + FeCl ₃	Ekstrak tanpa perlakuan (kontrol)
Alga hijau <i>Ulva sp.</i>	Coklat muda kehijauan dan endapan (+)	Coklat muda kehijauan dan endapan (+)	Coklat tua kehijauan dan endapan (+)	Coklat muda kehijauan dan jernih

Lampiran 4. Foto uji kualitatif alga hijau *Ulva sp.*



Keterangan : Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* sebelum diberi perlakuan.

**Keterangan :**

1. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* + gelatin 1 %
2. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* + gelatin 1 % + NaCl 10 %
3. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* + FeCl_3 LP
4. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* tanpa perlakuan (kontrol)



Keterangan : Gambar diambil setelah tiga hari sejak perlakuan uji kualitatif

1. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* + gelatin 1 %
2. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* + gelatin 1 % + NaCl 10 %
3. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* + FeCl₃ LP
4. Ekstrak alga hijau *Ulva sp.* tanpa perlakuan (kontrol)

Lampiran 5. Data penimbangan replikasi seri baku floroglusinol

Replikasi I:

Berat kertas + zat	=	0,45148 g
<u>Berat kertas + sisa</u>	=	<u>0,40029 g (-)</u>
Berat zat	=	0,05119 g → ad 50,0 ml aseton 75 %

Replikasi II:

Berat kertas + zat	=	0,44832 g
<u>Berat kertas + sisa</u>	=	<u>0,39604 g (-)</u>
Berat zat	=	0,05228 g → ad 50,0 ml aseton 75 %

Replikasi III:

Berat kertas + zat	=	0,49880 g
<u>Berat kertas + sisa</u>	=	<u>0,39798 g (-)</u>
Berat zat	=	0,10082 g → ad 100,0 ml aseton 75 %

Lampiran 6. Perhitungan seri kadar baku floroglusinol*Replikasi I:*

$$\text{Konsentrasi stok baku} = \frac{51,19\text{mg}}{50\text{ml}} = 1,0238 \text{ mg/ml}$$

$$C_1 = 1,0 \text{ ml} \cdot 1,0238 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,1024 \text{ mg/100ml}$$

$$C_2 = 2,0 \text{ ml} \cdot 1,0238 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,2048 \text{ mg/100ml}$$

$$C_3 = 3,0 \text{ ml} \cdot 1,0238 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,3071 \text{ mg/100ml}$$

$$C_4 = 4,0 \text{ ml} \cdot 1,0238 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,4095 \text{ mg/100ml}$$

$$C_5 = 5,0 \text{ ml} \cdot 1,0238 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,5119 \text{ mg/100ml}$$

$$C_6 = 6,0 \text{ ml} \cdot 1,0238 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,6143 \text{ mg/100ml}$$

Replikasi II:

$$\text{Konsentrasi stok baku} = \frac{52,28\text{mg}}{50\text{ml}} = 1,0456 \text{ mg/ml}$$

$$C_1 = 1,0 \text{ ml} \cdot 1,0456 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,1046 \text{ mg/100ml}$$

$$C_2 = 2,0 \text{ ml} \cdot 1,0456 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,2091 \text{ mg/100ml}$$

$$C_3 = 3,0 \text{ ml} \cdot 1,0456 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,3137 \text{ mg/100ml}$$

$$C_4 = 4,0 \text{ ml} \cdot 1,0456 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,4182 \text{ mg/100ml}$$

$$C_5 = 5,0 \text{ ml} \cdot 1,0456 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,5228 \text{ mg/100ml}$$

$$C_6 = 6,0 \text{ ml} \cdot 1,0456 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,6274 \text{ mg/100ml}$$

Replikasi III:

$$\text{Konsentrasi stok baku} = \frac{100,82\text{mg}}{100\text{ml}} = 1,0082 \text{ mg/ml}$$

$$C_1 = 1,0 \text{ ml} \cdot 1,0082 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,1008 \text{ mg/100ml}$$

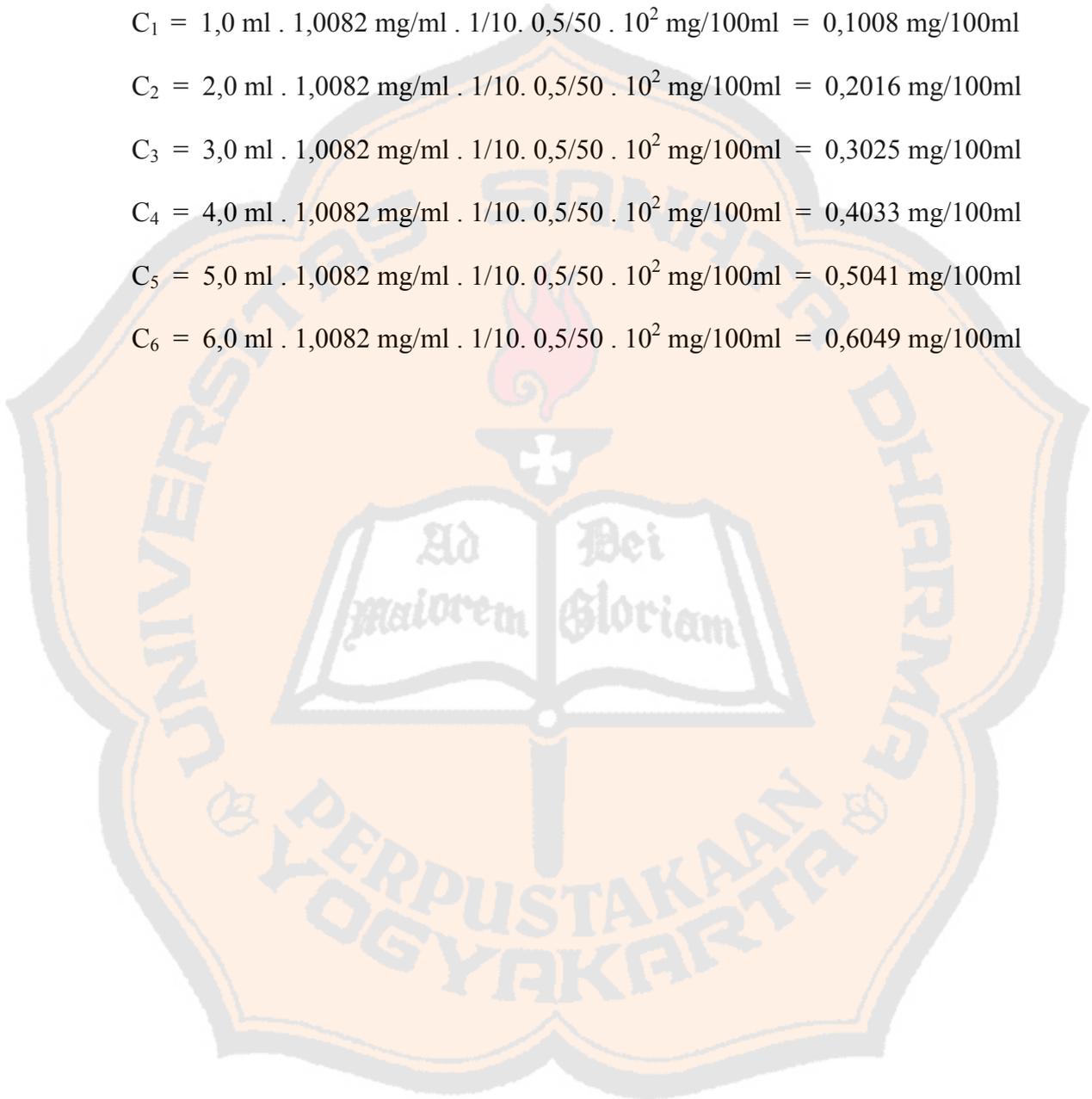
$$C_2 = 2,0 \text{ ml} \cdot 1,0082 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,2016 \text{ mg/100ml}$$

$$C_3 = 3,0 \text{ ml} \cdot 1,0082 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,3025 \text{ mg/100ml}$$

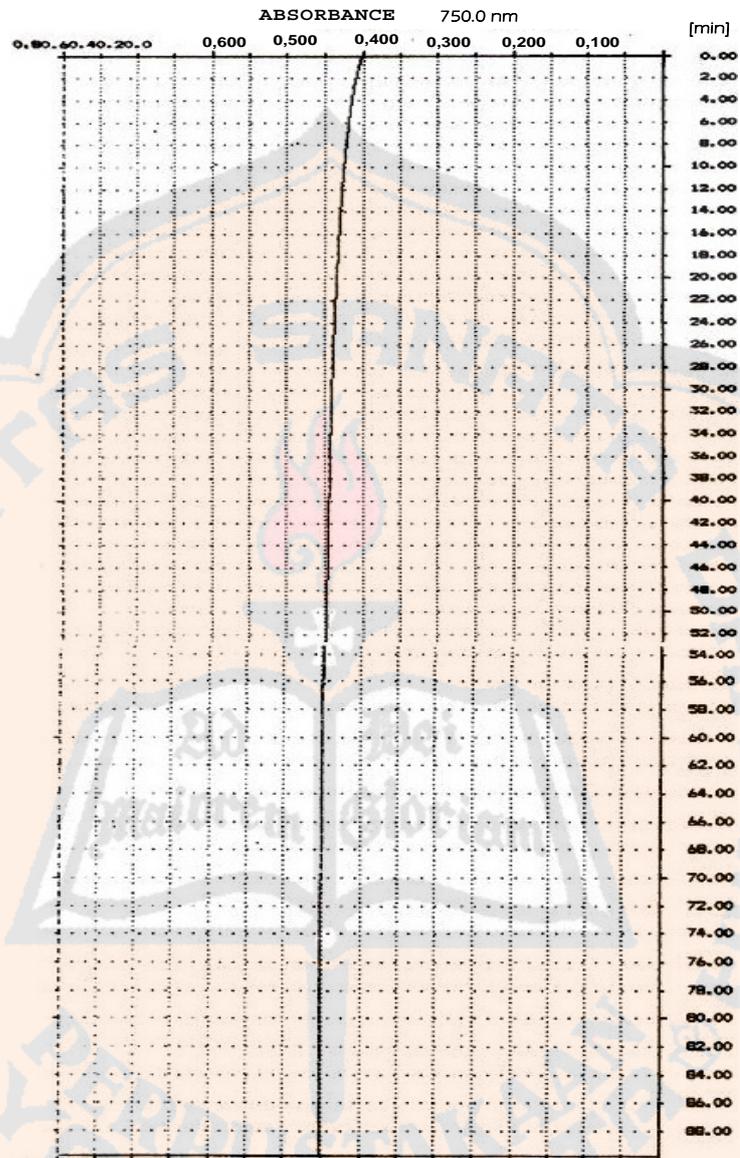
$$C_4 = 4,0 \text{ ml} \cdot 1,0082 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,4033 \text{ mg/100ml}$$

$$C_5 = 5,0 \text{ ml} \cdot 1,0082 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,5041 \text{ mg/100ml}$$

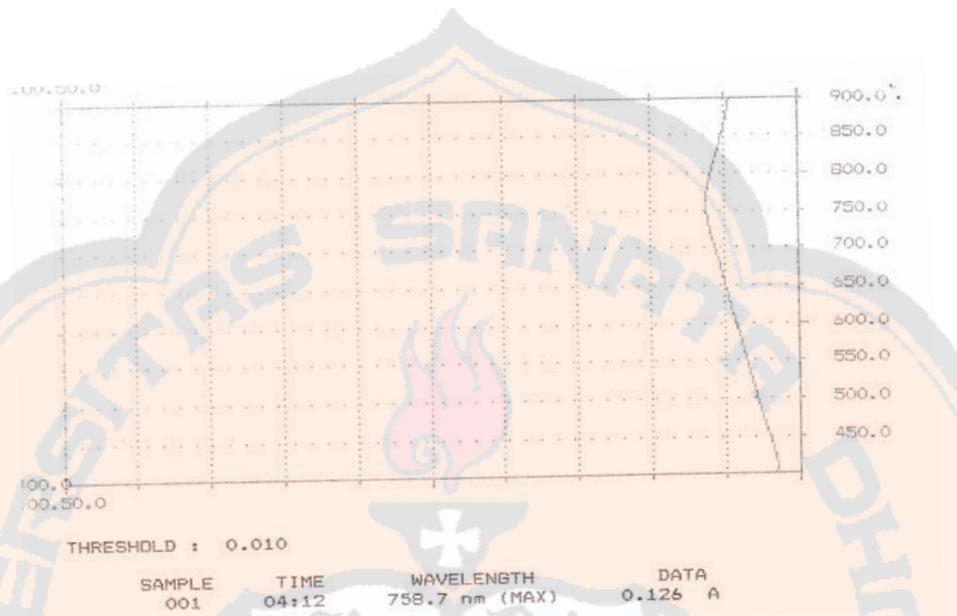
$$C_6 = 6,0 \text{ ml} \cdot 1,0082 \text{ mg/ml} \cdot 1/10 \cdot 0,5/50 \cdot 10^2 \text{ mg/100ml} = 0,6049 \text{ mg/100ml}$$



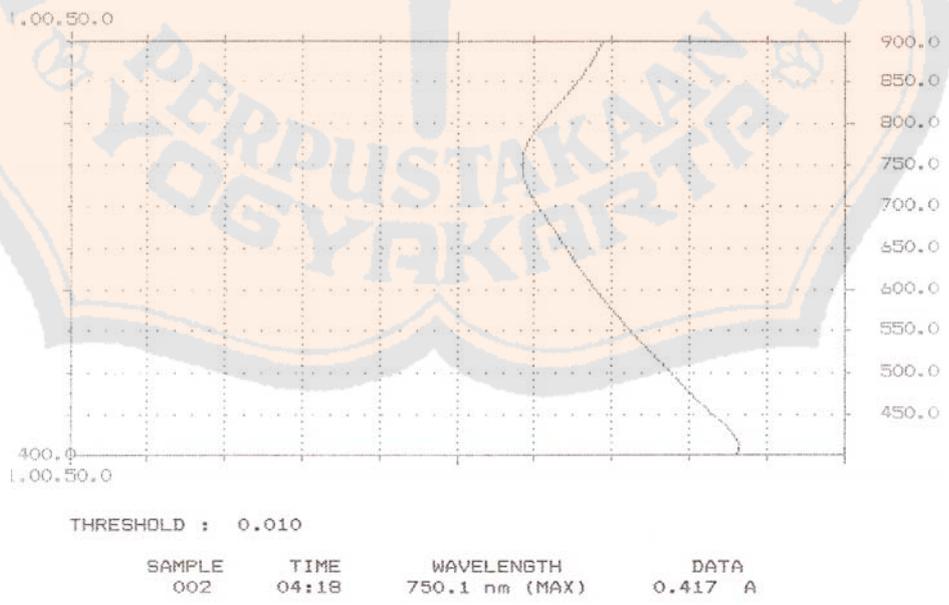
Lampiran 7. Hasil *Operating Time* (OT)



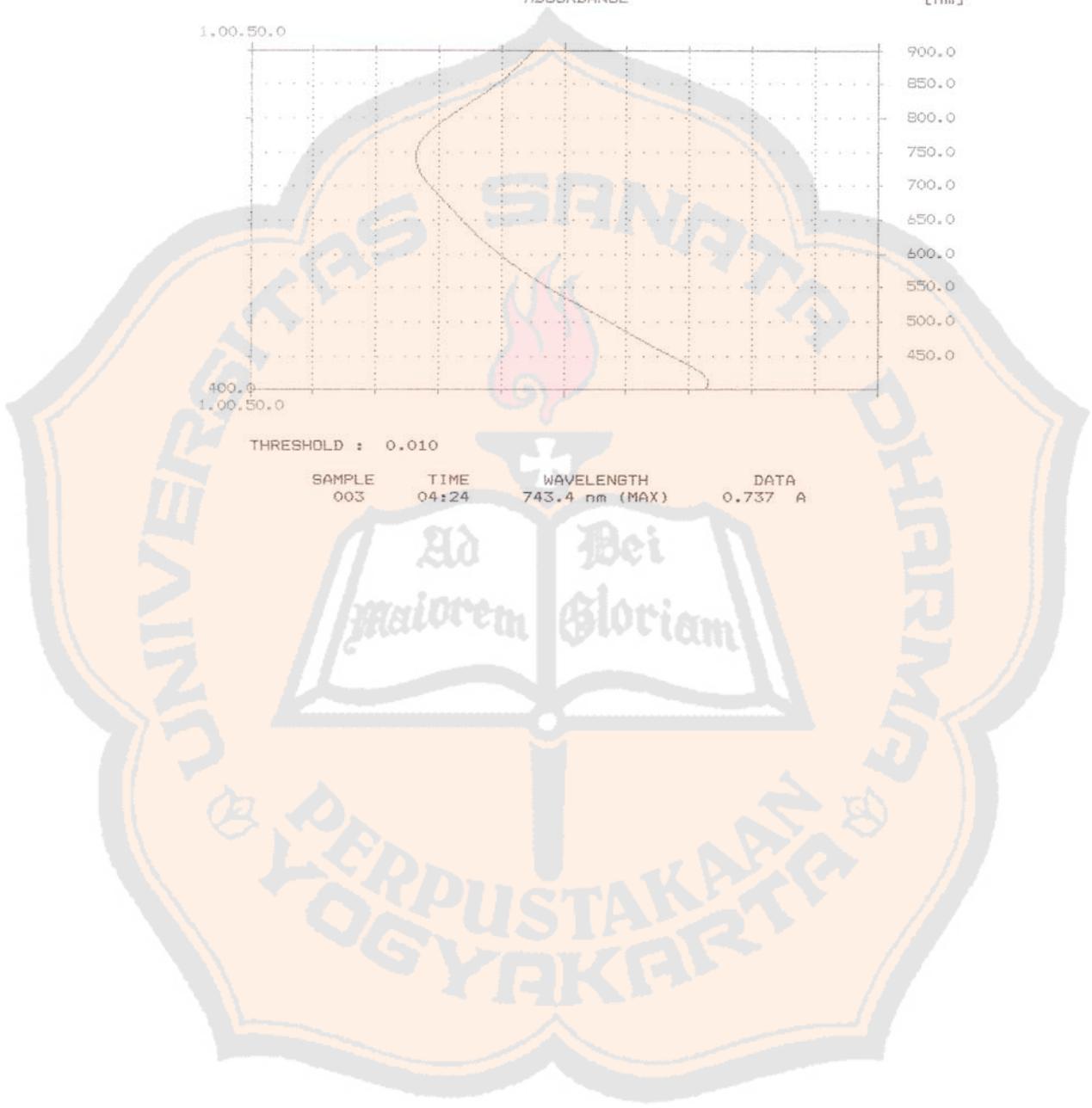
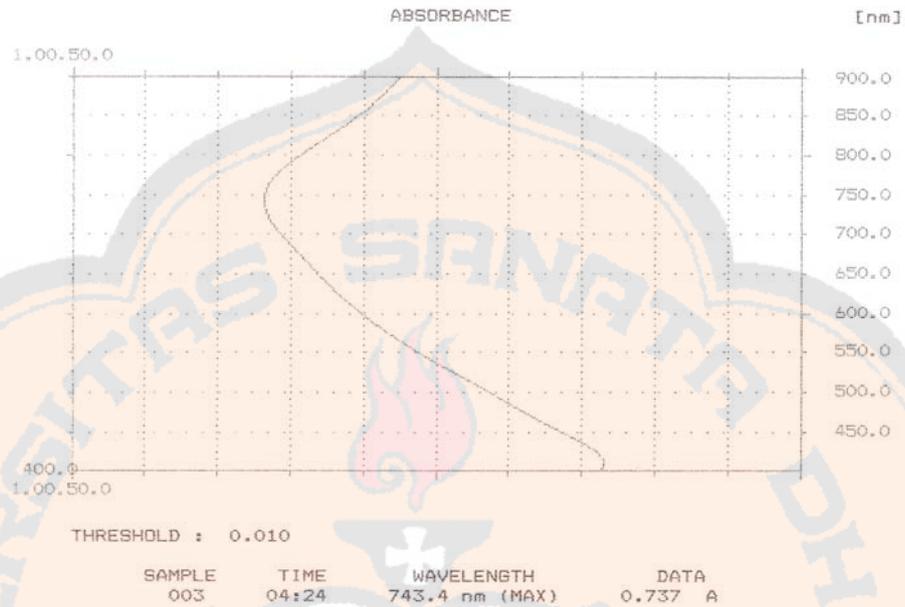
Lampiran 8. Hasil *scanning* λ_{maks} kadar floroglusinol 1,0 ppm setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteu



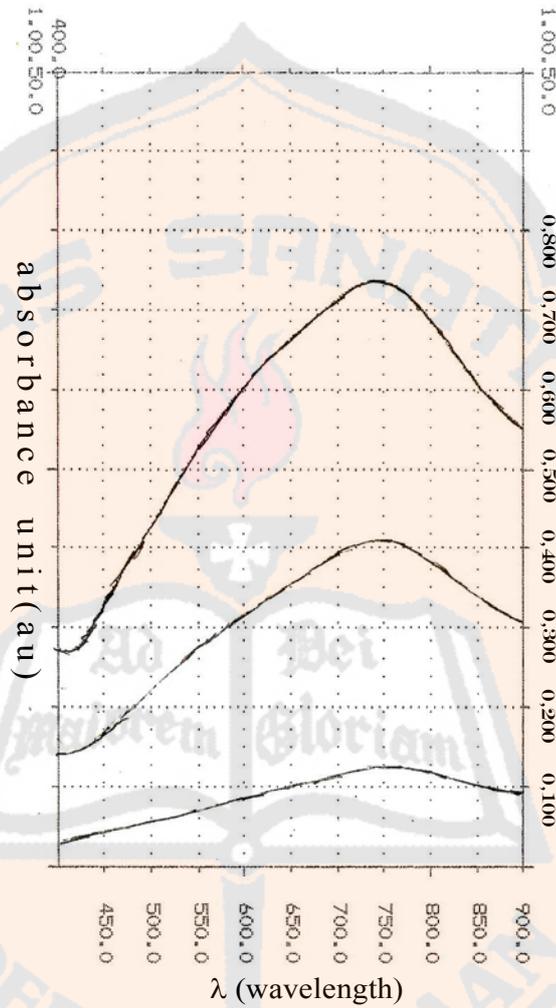
Lampiran 9. Hasil *scanning* λ_{maks} kadar floroglusinol 3,0 ppm setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteu



Lampiran 10. Hasil *scanning* λ_{maks} kadar floroglusinol 6,0 ppm setelah direaksikan dengan Folin Ciocalteu



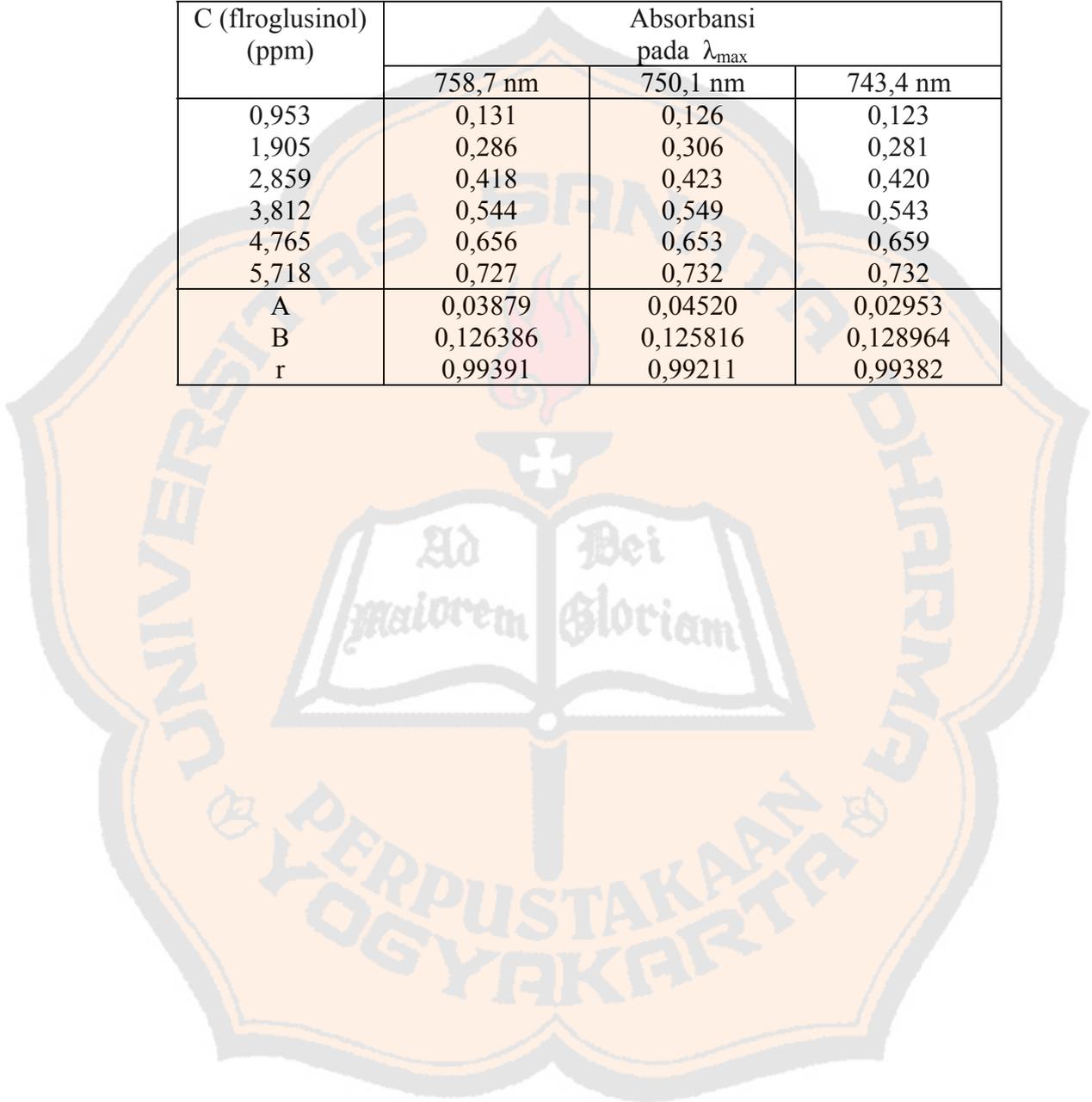
Lampiran 11. Hasil *scanning* panjang gelombang maksimum (λ_{max})



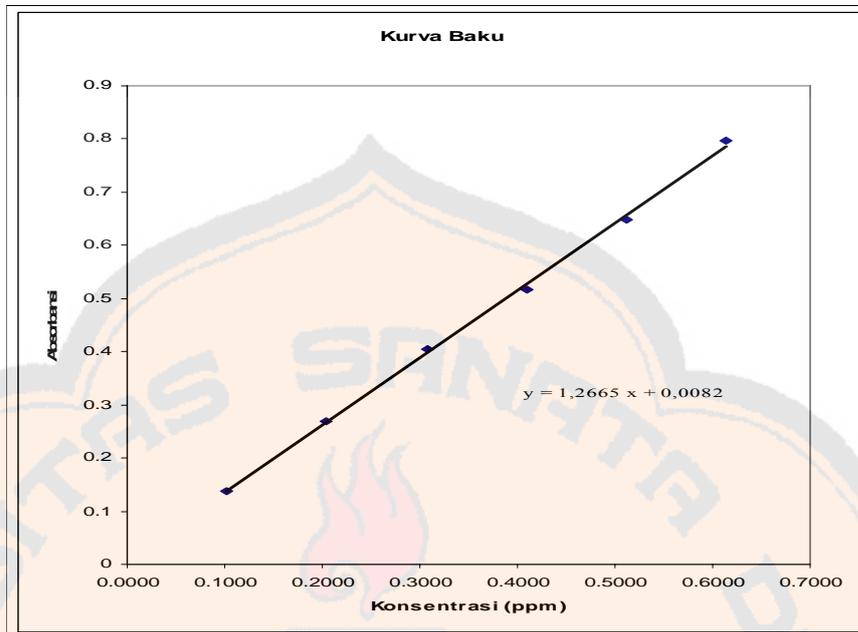
Lampiran 12. Hasil pembacaan absorbansi seri baku floroglusinol pada ketiga

λ_{maks}

C (floglusinol) (ppm)	Absorbansi pada λ_{maks}		
	758,7 nm	750,1 nm	743,4 nm
0,953	0,131	0,126	0,123
1,905	0,286	0,306	0,281
2,859	0,418	0,423	0,420
3,812	0,544	0,549	0,543
4,765	0,656	0,653	0,659
5,718	0,727	0,732	0,732
A	0,03879	0,04520	0,02953
B	0,126386	0,125816	0,128964
r	0,99391	0,99211	0,99382



Lampiran 13. Kurva baku floroglusinol



Lampiran 14. Data penimbangan sampel fraksi etil asetat Alga Hijau *Ulva sp.*

Replikasi I :

$$\text{Berat kaca arloji + zat} = 15,50898 \text{ g}$$

$$\text{Berat kaca arloji + sisa} = 15,45731 \text{ g (-)}$$

$$\text{Berat zat} = 0,05167 \text{ g} \rightarrow \text{ad } 50,0 \text{ ml aseton } 75\%$$

Replikasi II :

$$\text{Berat kaca arloji + zat} = 13,45772 \text{ g}$$

$$\text{Berat kaca arloji + sisa} = 13,40725 \text{ g (-)}$$

$$\text{Berat zat} = 0,05047 \text{ g} \rightarrow \text{ad } 50,0 \text{ ml aseton } 75\%$$

Replikasi III:

Berat kaca arloji + zat = 16,35523 g

Berat kaca arloji + sisa = 16,30306 g (-)

Berat zat = 0,05217 g → ad 50,0 ml aseton 75%

Lampiran 15. Data absorbansi sampel fraksi etil asetat Alga Hijau *Ulva sp.*

Scan pada $\lambda = 750,1 \text{ nm}$

Keterangan	absorbansi
Rep 1.1	0.149
Rep 1.2	0.149
Rep 2.1	0.162
Rep 2.2	0.122
Rep 3.1	0.155
Rep3.2	0.150

Lampiran 16. Perhitungan kadar sampel

Persamaan kurva baku : $Y = 1,2665 X + 0,0082$

Replikasi I :

Duplo 1 → $y = 0,149 \rightarrow x = 0,1112 \text{ mg}/100\text{ml}$

$$C_1 = \frac{1,112 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}}{0,05167 \text{ g}} \times \frac{50}{5} \times 50 \text{ ml} = 10,76 \text{ mg/g}$$

Duplo 2 → y = 0,149 → x = 0,1112 mg/100ml

$$C_2 = \frac{1,112 \cdot 10^{-3} \text{ mg / ml}}{0,05167 \text{ g}} \times \frac{50}{5} \times 50 \text{ ml} = 10,76 \text{ mg/g}$$

Replikasi II :

Duplo 1 → y = 0,162 → x = 0,1159 mg/100ml

$$C_1 = \frac{1,159 \cdot 10^{-3} \text{ mg / ml}}{0,05047 \text{ g}} \times \frac{50}{5} \times 50 \text{ ml} = 11,48 \text{ mg/g}$$

Duplo 2 → y = 0,122 → x = 0,0899 mg/100ml

$$C_2 = \frac{0,899 \cdot 10^{-3} \text{ mg / ml}}{0,05047 \text{ g}} \times \frac{50}{5} \times 50 \text{ ml} = 8,91 \text{ mg/g}$$

Replikasi III :

Duplo 1 → y = 0,155 → x = 0,1159 mg/100ml

$$C_1 = \frac{1,159 \cdot 10^{-3} \text{ mg / ml}}{0,05217 \text{ g}} \times \frac{50}{5} \times 50 \text{ ml} = 11,11 \text{ mg/g}$$

Duplo 2 → y = 0,150 → x = 0,1120 mg/100ml

$$C_2 = \frac{1,120 \cdot 10^{-3} \text{ mg / ml}}{0,05217 \text{ g}} \times \frac{50}{5} \times 50 \text{ ml} = 10,73 \text{ mg/g}$$

Lampiran 17. Perhitungan rata-rata kadar sampel

Replikasi I

$$\text{Rata-rata kadar} = \frac{(10,76 + 10,76)\text{mg} / \text{g}}{2} = 10,76 \text{ mg PGE/g fraksi}$$

Replikasi II

$$\text{Rata-rata kadar} = \frac{(11,48 + 8,91)\text{mg} / \text{g}}{2} = 10,20 \text{ mg PGE/g fraksi}$$

Replikasi III

$$\text{Rata-rata kadar} = \frac{(11,11 + 10,73)\text{mg} / \text{g}}{2} = 10,92 \text{ mg PGE/g fraksi}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kadar sampel} &= \frac{(10,76 + 10,20 + 10,92)\text{mgPGE} / \text{gfraksi}}{3} \\ &= 10,63 \text{ mg PGE/g fraksi} \end{aligned}$$

Sampel alga hijau <i>Ulva sp.</i>	Kadar florotanin	Rata-rata kadar
Replikasi I	1	10,76
	2	10,76
Replikasi II	1	11,48
	2	8,91
Replikasi III	1	11,11
	2	10,73
Rata-rata kadar florotanin dalam sampel		10,63

BIOGRAFI PENULIS



Elisabeth Budi Gunawan, penulis skripsi yang berjudul **Penetapan Kadar Florotanin dalam Fraksi Etil Asetat Alga Hijau *Ulva sp.* dengan Metode Kolorimetri Folin Ciocalteu**, lahir di kota Purwokerto, Jawa Tengah pada tanggal 1 Desember 1986 dari pasangan Bapak Tjahaja Gunawan dan Ibu Triana Susianti, memiliki saudara perempuan bernama Margareth Budi Gunawan. Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK Kasih Ibu, Purwokerto pada tahun 1991 hingga 1992 dan menyelesaikan pendidikan dasar di SD Kristen 02 Purwokerto pada tahun 1992 hingga 1998. Pendidikan SLTP ditempuh pada tahun 1998 hingga 2001, di SLTP Susteran, Purwokerto, dilanjutkan dengan menempuh pendidikan di SMU Negeri 01 Purwokerto, pada tahun 2001 hingga 2004. Penulis melanjutkan kuliah di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta pada tahun 2004 hingga 2008. Selama kuliah, penulis pernah menjadi asisten dosen pada mata kuliah praktikum Sintesis Obat (2008).

