



**PENENTUAN POLIFENOL PADA MADU MENGGUNAKAN
SISTEM ALIR *MULTI-COMMUTATION* DENGAN
DETEKSI SPEKTRIFOTOMETRI UV-VIS**

SKRIPSI

Oleh
Felatiana
NIM 151810301020

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2021**



**PENENTUAN POLIFENOL PADA MADU MENGGUNAKAN
SISTEM ALIR *MULTI-COMMUTATION* DENGAN
DETEKSI SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah
satu syarat untuk menyelesaikan Studi Kimia (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:
Felatiana
NIM 151810301020

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2021**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibunda Wagina, Ayahanda Atem dan adik saya Loewiz Zhufi Zahreta yang tercinta, terima kasih atas doa, motivasi, saran serta kasih sayang yang tiada henti diberikan. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayahnya baik di dunia maupun di akhirat. Aamiin;
2. almamater tercinta Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, Bapak dan Ibu guru SDN Jatisari 01, SMPN 03 Jenggawah, SMA Negeri Ambulu, serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA UNEJ yang telah mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan;
3. tim kimia analitik Faradila Anjani Rohim serta teman seperjuangan Chrypton 2015 yang telah memberikan doa serta dorongan semangat yang tiada henti;
4. sahabat saya Eka Sri Wahyuni, Chanifa Dwi Happy Pratiwi, Nuzul Hekmah Dewi, Pungki Vidya J, Liana Anjarwati, Ani Sofiyana, dan Hilyatul Husna yang telah menemani, memberi semangat, dan membantu dalam proses pembuatan skripsi ini;
5. semua pihak yang turut berkontribusi dalam penyelesaian skripsi ini, namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

MOTTO

Bukankah Kami telah melapangkan dadamu?, dan Kami pun telah menurunkan bebanmu darimu, yang memberatkan punggungmu, dan Kami tinggikan sebutan nama(mu) bagimu. Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.

(Q.S Al Insyirah)*

Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan suatu kaum sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri.

(Q.S Ar-Ro'du : 11)*

*Kementrian agama RI. 2010. Al-Qur'an dan Terjemah untuk Wanita. Bandung: Jabal.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Felatiana

NIM : 151810301020

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Penentuan Polifenol pada Madu Menggunakan Sistem Alir *Multi-commutation* dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis” adalah benar-benar hasil karya sendiri kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 05 Februari 2021

Yang menyatakan,

Felatiana
NIM 151810301020

SKRIPSI

**PENENTUAN POLIFENOL PADA MADU MENGGUNAKAN
SISTEM ALIR *MULTI-COMMUTATION* DENGAN
DETEKSI SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

SKRIPSI

Oleh

**Felatiana
NIM 151810301020**

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Tri Mulyono, S.Si., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Asnawati, S.Si., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Penentuan Polifenol pada Madu Menggunakan Sistem Alir *Multi-commutation* dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis” karya Felatiana; Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam telah diuji dan disahkan pada :

hari,tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Anggota I,

Tri Mulyono, S.Si., M.Si.
NIP. 196810021998021001

Asnawati, S.Si., M.Si.
NIP. 196808141999032001

Anggota II,

Anggota III,

Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D.
NIP. 196605291993031003

Tanti Haryati, S.Si., M.Si.
NIP. 198010292005012002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Drs.Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D.
NIP. 195910091986021001

RINGKASAN

“Penentuan Polifenol pada Madu Menggunakan Sistem Alir *Multi-commutation* dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis” ; Felatiana, 151810301020;2021;70 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Polifenol atau senyawa fenolik merupakan salah satu kelompok senyawa dengan ciri khas yaitu terdapat banyak gugus hidroksil dalam molekulnya. Polifenol berperan sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam mereduksi radikal bebas. Senyawa polifenol salah satunya terdapat pada madu yaitu, antara lain flavonoid (quersetin, luteolin, kaempferol, apigenin, chrysin, galangin), asam fenolat, dan turunannya. Polifenol pada madu ini berfungsi sebagai zat antibakteri dan menjaga tubuh dari serangan radikal bebas yang bisa memicu penyakit kanker dan jantung. Berdasarkan uraian tersebut maka diperlukan analisis kadar polifenol secara kuantitatif untuk mengetahui kadar polifenol pada madu. Teknik analisis yang digunakan yaitu MCFIA (*Multi-commutation Flow Injection Analysis*). MCFIA adalah metode yang digunakan untuk menentukan kadar polifenol dan dikombinasikan dengan detektor spektrofotometri UV-Vis. MCFIA merupakan metode modifikasi FIA (*Flow Injection Analysis*) yaitu analisis kimia dengan cara menginjeksikan sejumlah volume sampel ke dalam suatu aliran *carrier* yang kemudian membawanya menuju detektor.

Teknik analisis MCFIA terdiri dari beberapa komponen utama, yaitu: *three-way solenoid valve*, *reaction coil*, pompa peristaltik, dan detektor spektrofotometri UV-Vis. Komponen pendukung diantaranya komputer (*software Labview 2018*), Arduino Uno sebagai mikrokontroler, *relay*, *power supply*, dan *webcam* sebagai perekam data dari detektor. Pompa peristaltik akan menarik *carrier* (akuades) pada saat katup solenoid dalam keadaan mati menuju detektor sehingga menghasilkan suatu *baseline*. *Three way valve solenoid* secara bergantian diaktifkan dimana katup V_1 untuk sampel atau larutan standar asam

galat, katup V_2 untuk larutan natrium karbonat 10%, dan katup V_3 untuk reagen Folin-Ciocalteu. Pengaktifan katup selenoid yang secara bergantian dilakukan dengan memberikan suatu arus listrik dan menggunakan Arduino Uno sebagai mikrokontroler dan terhubung dengan software LabView.

Larutan yang keluar dari katup selenoid akan menuju ke *mixing coil* sehingga terjadi pencampuran yang kemudian menuju detektor spektrofotometri UV-Vis. Detektor akan mendeteksi dan akan memberikan respon berupa absorbansi yang direkam menggunakan *webcam*. Kerja dari *webcam* yaitu menggunakan teknik OCR (*Optical Character Recognition*). Teknik ini digunakan untuk mengubah file gambar yang diambil melalui *webcam* di tampilan layar absorbansi pada spektrofotometri UV-Vis, menjadi *digital teks* yaitu data dalam bentuk *numeric* pada komputer. Alat yang telah terangkai selanjutnya dilakukan optimasi volume injeksi larutan natrium karbonat 10% dan reagen Folin-Ciocalteu. Variasi volume injeksi yang digunakan adalah 75, 100, 125, 150 dan 175 μL , dengan panjang gelombang maksimum 660 nm, laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$, dan diameter pipa 0,8 mm. Hasil optimasi diperoleh volume injeksi larutan natrium karbonat 10% dan reagen Folin-Ciocalteu adalah 150 μL dan 125 μL . Volume injeksi optimum digunakan untuk pengukuran larutan standar dan sampel.

Kinerja sistem alir MCFIA ditunjukkan dari beberapa kriteria pengukuran analitik, yaitu linieritas, sensitivitas, limit deteksi, repeatabilitas dan uji perolehan kembali. Linieritas dari persamaan $y = 0,0022x + 0,0465$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9985, sensitivitas sebesar 0,0022 absorbansi/ppm, limit deteksi sebesar 1,6 ppm, repeatabilitas kurang dari 2% dan uji perolehan kembali (*% recovery*) dari beberapa sampel madu tanpa merk, madu merk “Madu Rasa”, madu murni yaitu 120%; 89,2%; 118%. Volume injeksi berpengaruh terhadap nilai absorbansi serta puncak yang dihasilkan. Volume injeksi yang sesuai akan memberikan puncak dengan nilai absorbansi yang tinggi.

PRAKATA

Alhamdulillah puji syukur atas kehadiran Allah SWT. Atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Polifenol pada Madu Menggunakan Sistem Alir *Multi-commutation* dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata 1 (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Drs.Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si. selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Kepala Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
4. Tri Mulyono S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam penulisan skripsi ini;
5. Asnawati S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dan membimbing penulisan skripsi ini dengan penuh kesabaran;
6. Drs.Siswoyo, M.Sc., Ph.D. selaku dosen penguji I dan Tanti Haryati S.Si., M.Si. selaku dosen penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji, mengkritik serta memberikan saran demi terbentuknya skripsi yang baik;
7. bapak dan ibu dosen FMIPA UNEJ terutama bapak dan ibu dosen jurusan kimia yang telah mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan;
8. Teknisi-teknisi Laboratorium Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
9. Eka Sri Wahyuni, Chanifa Dwi Happy Pratiwi, Nuzul Hekmah Dewi, Pungki Vidya J, Liana Anjarwati, Ani Sofiyana, dan Hilyatul Husna terima

kasih atas persahabatan, kerjasama, dorongan semangat demi terselesaikannya skripsi ini;

10. teman-teman “Chrypton 2015” terima kasih karena telah memberikan semangat, saran dan bantuan selama menyusun skripsi ini;
11. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat ilmu pengetahuan bagi pembaca.

Jember, 05 Februari 2021

Penulis



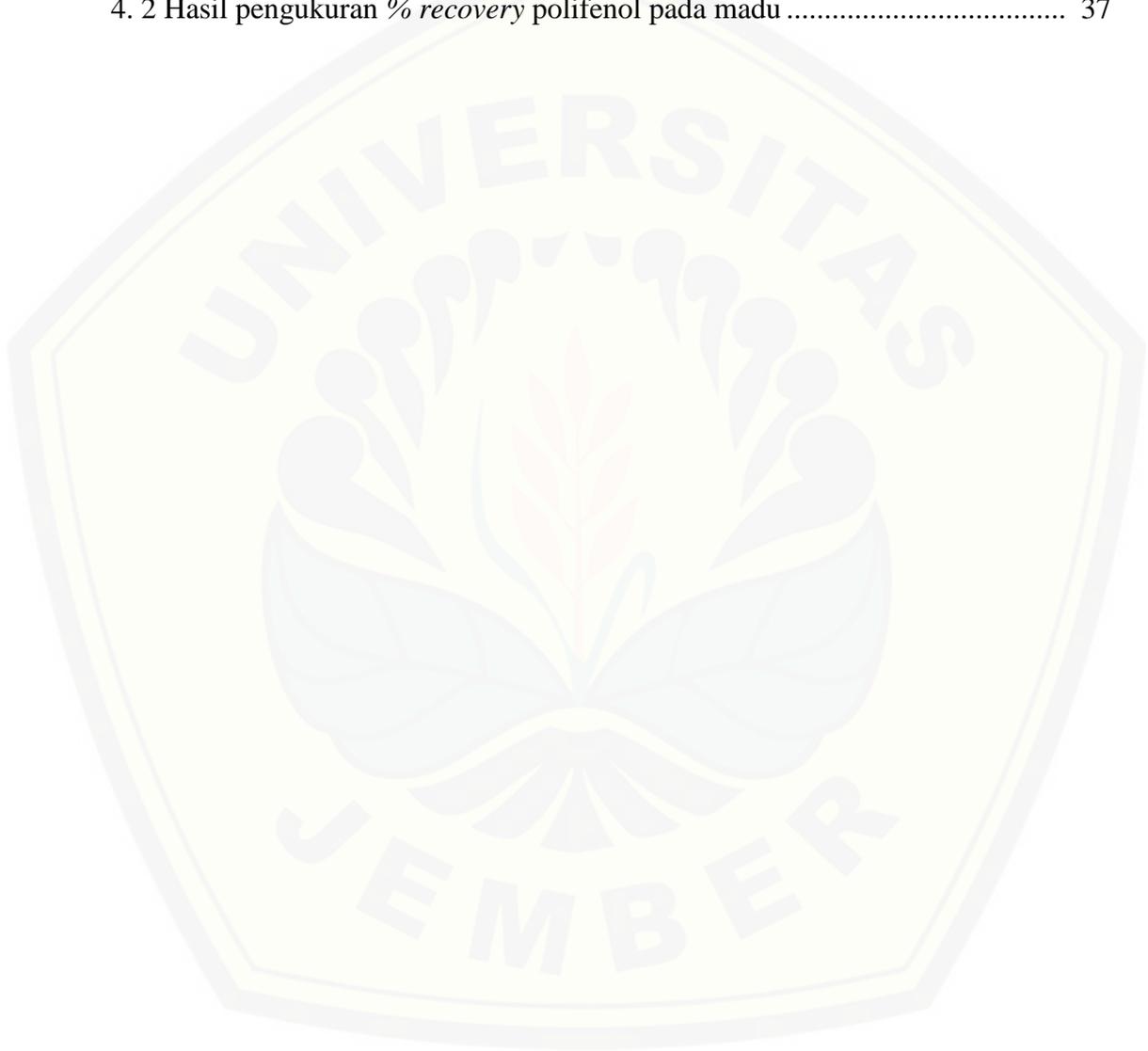
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Batasan Masalah	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Polifenol	5
2.2 Madu	6
2.3 <i>Flow Injection Analysis</i> (FIA).....	7
2.4 <i>Multi-commutation in Flow Injection Analysis</i>.....	7
2.4.1 Instrumentasi <i>Multi-commutation</i> FIA	9
2.4.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Analisis Sistem Alir	13
2.5 Spektrofotometri UV-Vis	15
2.6 <i>Software LabVIEW</i>.....	18
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.2.1 Alat	20
3.2.2 Bahan.....	20
3.3 Diagram Alir	21
3.4 Prosedur Penelitian.....	21
3.4.1 Preparasi larutan dan sampel	21
3.4.2 Skema alat	22
3.4.3 Prosedur sistem alir <i>Multi-commutation</i>	23
3.4.4 Penentuan panjang gelombang maksimum	23
3.4.5 Penentuan volume larutan Na ₂ CO ₃ 10%	24

3.4.6 Penentuan volume reagen Folin-Ciocalteu.....	24
3.4.7 Pembuatan kurva kalibrasi asam galat	24
3.4.8 Pengukuran sampel.....	25
3.4.9 Karakteristik data	25
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Optimasi Volume Injeksi Larutan Natrium Karbonat dan Reagen Folin-Ciocalteu	30
4.2 Kurva Kalibrasi	32
4.3 Analisis Sampel	36
4.4 Uji Perolehan Kembali (<i>Recovery</i>)	36
BAB 5. PENUTUP.....	38
5.1 Kesimpulan.....	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
2. 1 Spektrum sinar tampak dan warna-warna komplementernya	17
4. 1 Hasil pengukuran asam galat (polifenol) dalam madu.....	36
4. 2 Hasil pengukuran % <i>recovery</i> polifenol pada madu	37



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2. 1 Reaksi metode Folin-Ciocalteu	6
2. 2 Katup solenoid tiga arah.....	8
2. 3 Sistem <i>Multi-commutation</i>	8
2. 4 Pembentukan aliran pada <i>reaction coil</i> . S_1 dan S_2 : larutan; V : <i>three way solenoid valve</i> ; R : <i>reaction coil</i> ; D : detektor (Rocha dkk., 2002)	9
2. 5 Pompa Peristaltik	10
2. 6 Sistem kerja <i>three-way solenoid valve</i>	11
2. 7 Modul Mikrokontroler Arduino Uno	12
2. 8 Pengaruh panjang reaktor terhadap proses dispersi	13
2. 9 Pengaruh diameter pipa terhadap proses dispersi	14
2. 10 Pengaruh injeksi volume terhadap proses dispersi.....	15
2. 11 Pengaruh laju alir terhadap proses dispersi	15
2. 12 Spektrum Elektromagnetik.....	16
3. 1 Diagram analisis polifenol total pada madu dengan metode sistem alir <i>Multi-commutation</i> menggunakan spektrofotometri UV-Vis	21
3. 2 Desain instrumentasi analisis polifenol pada madu	22
3. 3 Model sistem aliran <i>Multicommuation</i>	23
4. 1 Reaksi penentuan polifenol dengan metode Folin-Ciocalteu.....	28
4. 2 Profil serapan panjang gelombang maksimum kompleks <i>molybdenum-blue</i> pada panjang gelombang 600-750 nm dengan interval 10 nm	29
4. 3 Profil puncak absorbansi dari variasi volume larutan natrium karbonat pada larutan asam galat 500 ppm	30
4. 4 Kurva pengaruh volume injeksi larutan natrium karbonat terhadap nilai absorbansi.....	31
4. 5 Profil puncak absorbansi dari variasi volume reagen Folin-Ciocalteu pada larutan asam galat 500 ppm	31
4. 6 Kurva pengaruh volume injeksi reagen Folin-Ciocalteu.....	32
4. 7 Profil puncak absorbansi larutan standart asam galat menggunakan metode sistem alir <i>multi-commutation</i> dengan deteksi spektrofotometri UV-Vis.....	33
4. 8 Kurva kalibrasi larutan standar asam galat	33
4. 9 Konsistensi nilai pengukuran polifenol pada masing-masing konsentrasi ...	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3. 1 Pembuatan Larutan Asam Galat	43
Lampiran 4. 1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	44
Lampiran 4. 2 Optimasi Volume Injeksi.....	45
Lampiran 4. 3 Data Kurva Kalibrasi	46
Lampiran 4. 4 Perhitungan Limit Deteksi.....	47
Lampiran 4. 5 Perhitungan Keterulangan (<i>Repeatability</i>)	48
Lampiran 4. 6 Perhitungan Konsentrasi Polifenol dalam Sampel	48
Lampiran 4. 7 Uji <i>Recovery</i>	50
Lampiran 4. 8 Konversi satuan ppm ke satuan molaritas	54

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Polifenol atau senyawa fenolik merupakan salah satu kelompok senyawa yang penting dalam tanaman dan keberadaannya tersebar merata. Polifenol memiliki ciri khas yaitu terdapat banyak gugus hidroksil dalam molekulnya. Flavanoid dan asam fenolik adalah kelas paling penting dari senyawa polifenol (Pyrzynska dan Biesaga, 2009). Polifenol mempunyai aktivitas sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam mereduksi radikal bebas. Antioksidan adalah sifat suatu senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan salah satu atom hidrogennya. Reaksi radikal bebas terhadap sel-sel tubuh berpotensi menyebabkan timbulnya berbagai gejala penyakit seperti kanker, jantung, katarak, dan penyakit degeneratif yang banyak menyerang manusia (Ustadi dkk., 2017).

Senyawa antioksidan polifenol banyak terdapat pada madu. Madu merupakan bahan makanan yang digunakan untuk bahan pemanis tetapi juga bisa untuk mengobati berbagai penyakit. Senyawa antioksidan pada madu antara lain flavonoid (quersetin, luteolin, kaempferol, apigenin, chrysin, galangin), asam fenolat, dan turunannya yang termasuk kelas polifenol. Polifenol pada madu ini berfungsi sebagai zat antibakteri dan menjaga tubuh dari serangan radikal bebas (Bogdanov dkk, 2008).

Berdasarkan uraian tersebut, maka diperlukan analisis kadar polifenol pada madu. Metode analisis polifenol pada madu telah dilakukan oleh Rahayu (2012), Saputri dan Putri (2017) menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Metode ini adalah analisis yang umum sebagai standar penentuan kandungan fenolik total karena merupakan metode yang cepat dan sederhana menggunakan asam galat sebagai larutan standar. Penelitian-penelitian ini menggunakan deteksi spektrofotometri UV-Vis secara konvensional. Metode tersebut memerlukan penggunaan sampel dan reagen yang banyak serta limbah yang dihasilkan juga

banyak. Oleh karena itu, penelitian tentang polifenol memerlukan modifikasi metode lain yang bisa digunakan yaitu menggunakan *flow injection analysis*.

Flow Injection Analysis (FIA) adalah metode analisis kimia dengan cara menginjeksikan sejumlah volume sampel ke dalam suatu aliran *carrier* yang menuju detektor. Penelitian sebelumnya dilakukan oleh Leamsomrong dkk (2009) untuk penentuan polifenol dengan metode FIA. Sistem FIA juga mempunyai beberapa kekurangan yaitu penggunaan reagen yang relatif tinggi dan limbah yang dihasilkan lebih besar. Beberapa keterbatasan ini dapat diminimalkan melalui konsep *multi-commutation*. Sistem alir *multi-commutation* dapat ditandai dengan penggunaan perangkat pergantian individu (biasanya katup solenoid). Sistem alir *multi-commutation* menggunakan perangkat katup solenoid yang dapat diatur sebagai jaringan aliran secara manual ataupun dikontrol menggunakan komputer dengan sebuah *software* kontrol. *Multi-commutation in Flow Injection Analysis* mengacu pada rancangan sistem kendali oleh komputer sehingga pada semua langkah yang terlibat dalam pengolahan sampel dapat dilaksanakan secara otomatis.

Multi-commutation memiliki beberapa keuntungan, seperti meningkatkan fleksibilitas sistem aliran, meningkatkan pencampuran, memfasilitasi otomatisasi, dan mengurangi konsumsi reagen yang terlalu banyak. Beberapa faktor yang mempengaruhi analisis sistem alir yaitu panjang reaktor, diameter pipa, laju alir, dan injeksi volume. Sistem alir *Multi-commutation* sebagai hasil pengembangan FIA merupakan metode yang dapat digunakan untuk menganalisis kandungan polifenol. Beberapa penelitian telah menggunakan metode ini, yaitu metode sistem alir *multi-commutation* untuk penentuan klorin dalam beras (Ulfa, 2018), serta untuk menganalisis kandungan ion nitrat dan ammonium dalam air (Hikmah, 2019).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini menggunakan metode sistem alir *multi-commutation flow injection analysis* (MCFIA) untuk menentukan kandungan polifenol dalam madu. Sistem alir tersebut dihubungkan dengan spektrofotometri UV-Vis sebagai detektornya. Metode MCFIA diharapkan dapat menentukan polifenol pada madu secara cepat dan efisien.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh volume injeksi larutan natrium karbonat dan reagen Folin-Ciocalteu terhadap respon deteksi polifenol dengan menggunakan metode sistem alir *multi-commutation* spektrofotometri UV-Vis?
2. Bagaimana kinerja pengukuran polifenol menggunakan metode *Flow Injection Analysis Multi-Commutation* dengan deteksi spektrofotometri UV-Vis meliputi linieritas, sensitivitas, limit deteksi, repeatabilitas dan uji perolehan kembali?
3. Berapa kadar polifenol pada madu menggunakan *Multi-Commutated Flow Injection Analysis* (MCFIA) dengan deteksi spektrofotometri UV-Vis?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui pengaruh volume injeksi larutan natrium karbonat dan reagen Folin-Ciocalteu terhadap respon deteksi polifenol dengan menggunakan metode sistem alir *multi-commutation* spektrofotometri UV-Vis.
2. Mengetahui kinerja pengukuran polifenol menggunakan metode *Flow Injection Analysis Multi-Commutation* dengan deteksi spektrofotometri UV-Vis meliputi linieritas, sensitivitas, limit deteksi, repeatabilitas dan uji perolehan kembali.
3. Mengetahui kadar polifenol pada madu menggunakan *Multi-Commutated Flow Injection Analysis* (MCFIA) dengan deteksi spektrofotometri UV-Vis.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi penelitian terkait analisis sistem alir *multi-commutation* menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan sebagai analisa alternatif dalam menentukan kandungan polifenol pada madu.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini meliputi:

1. Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu madu tanpa merk, madu merk “Madu Rasa”, dan madu murni yang didapatkan dari petani lebah madu hutan di Desa Garahan Kecamatan Silo Kabupaten Jember.
2. Laju alir dalam penelitian ini yakni 25 μL /detik.
3. Diameter pipa yang digunakan 0,8 mm.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

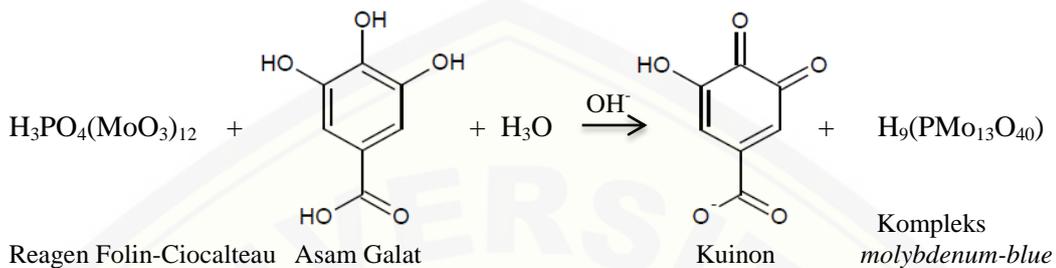
2.1 Polifenol

Senyawa polifenol atau fenolik adalah senyawa yang disintesis oleh tanaman dan bertanggung jawab mengatasi berbagai macam kondisi, misalnya infeksi, luka, dan radiasi UV. Senyawa bioaktif tanaman sekitar 8000 senyawa termasuk dalam kelompok senyawa fenolik. Senyawa fenolik memiliki struktur umum cincin aromatis dengan satu atau lebih gugus hidroksil (Smirnoff, 2005). Senyawa fenolik mempunyai karakter yaitu paling tidak satu cincin aromatis dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa ini sangat beragam mulai dari senyawa fenolik sederhana, senyawa fenolik dengan bobot molekul rendah, senyawa fenolik dengan cincin aromatis tunggal hingga senyawa turunan fenolik yang kompleks (Hakkinen, 2000).

Kandungan polifenol dalam suatu sampel dapat diukur secara kolorimetri dengan metode Folin-Ciocalteu. Prinsip metode Folin-Ciocalteu yaitu reaksi oksidasi dan reduksi kolorimetrik untuk mengukur semua senyawa fenolik dalam sampel uji. Pereaksi Folin-Ciocalteu merupakan larutan kompleks ion polimerik yang dibentuk dari asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfotungstat. Pereaksi ini terbuat dari air, natrium tungstat, natrium molibdat, asam fosfat, asam klorida, litium sulfat, dan bromin (Nurhayati dkk., 2012).

Prinsip dasar metode ini adalah oksidasi gugus fenolik-hidroksil. Pereaksi Folin-Ciocalteu mengoksidasi fenolat serta mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks *molybdenum-blue*. Gugus fenolik-hidroksil akan bereaksi selama reaksi berlangsung dengan pereaksi Folin-Ciocalteu membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru. Warna biru yang dihasilkan semakin pekat maka setara dengan konsentrasi senyawa fenolik yang terdapat pada larutan uji dan memiliki serapan kuat pada panjang gelombang 760 nm. Metode Folin-Ciocalteu yaitu metode yang sederhana, sensitif dan teliti. Metode ini terjadi dalam suasana basa sehingga dalam penentuan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-Ciocalteu digunakan natrium karbonat yang bertujuan untuk membentuk

suasana basa (Kate, 2014). Penentuan polifenol biasanya dengan mengukur kandungan asam galat. Asam galat merupakan polifenol murni dan stabil yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Gambar 2.1 merupakan mekanisme penentuan polifenol dengan metode Folin-Ciocalteu.



Gambar 2. 1 Reaksi metode Folin-Ciocalteu
(Kate, 2014)

2.2 Madu

Madu merupakan zat pemanis alami yang diproduksi oleh lebah *Apis Mellifera*. Lebah mengumpulkan nektar tanaman atau bagian lain dari tanaman hidup atau ekskresi serangga (Huang dkk., 2015). Madu adalah campuran gula yang dibentuk dari nektar oleh suatu enzim invertase yang ada di dalam tubuh lebah. Madu tidak boleh diberi bahan tambahan lain, termasuk air atau pemanis lain. Bahan baku pembuatan madu adalah sari atau nektar dari bunga. Lebah madu mengumpulkan nektar, kemudian membawa ke rumah lebah, dan memprosesnya menjadi madu. Madu mengubah struktur kimia nektar, dan mengipasi dengan udara hangat untuk menurunkan kadar air nektar dari sekitar 60% menjadi 20% atau bahkan lebih rendah. Madu menjadi sangat rendah kadar airnya sehingga bisa menyerap kelembapan udara sekitar seperti spons. Lebah di dalam rumahnya menutup sel-sel dengan lilin untuk mengawetkan madunya (Chayati, 2008).

Madu murni memiliki beberapa kandungan gizi seperti karbohidrat, protein, asam amino, vitamin dan mineral. Vitamin yang terkandung di dalam madu antara lain Vitamin B1, B2, B3, B6, C, A, E, dan flavonoid. Kandungan mineralnya yaitu Na, Ca, K, Mg, Cl, Fe, Zn dan lain-lain. Kandungan nutrisi pada madu yang berfungsi sebagai antioksidan adalah vitamin C, B3, asam organik, enzim, asam fenolik, flavonoid, vitamin A serta vitamin E (Bogdanov dkk, 2008).

Madu murni mempunyai kandungan polifenol yaitu sekitar 56-500 mg/kg polifenol total yang ditemukan pada berbagai jenis madu. Polifenol pada madu utamanya adalah flavonoid (quersetin, luteolin, kaempferol, apigenin, chrysin, galangin), asam fenolat, dan turunannya. Senyawa-senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Kandungan flavonoid bervariasi antara 60-460 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ madu (Bogdanov dkk., 2008). Kandungan polifenol mempengaruhi warna, aroma dan rasa pada produk nabati, termasuk buah-buahan, sayuran dan sereal. Senyawa polifenol (flavonoid dan asam fenolat) ditemukan dalam berbagai jenis madu. Madu yang mempunyai warna yang lebih gelap mengandung polifenol dengan jumlah yang lebih tinggi (Jibril dkk., 2019).

2.3 Flow Injection Analysis (FIA)

Flow Injection Analysis yaitu suatu teknik analisis yang didasarkan pada penginjeksian sampel ke dalam larutan *carrier* atau reagen yang kemudian membawa sampel menuju detektor dimana terjadi reaksi kimia yang diinginkan (Mulyono dkk., 2013). Prinsip kerja *flow injection analysis* didasarkan pada pemasukan sejumlah volume tertentu dari sampel ke dalam aliran *carrier*. Aliran *carrier* kemudian akan mengalir melewati *loop* sebagai pemberi tenaga bagi reagen untuk terjadinya reaksi kimia antara sampel dan reagen, dan bila perlu larutan *buffer* dialirkan oleh pompa peristaltik. Sampel dan reagen dialirkan dengan menggunakan pompa. Total aliran kemudian mengalir menuju detektor sebagai satu kesatuan membentuk suatu zona dan selanjutnya menuju pembuangan (Kennedy, 1990).

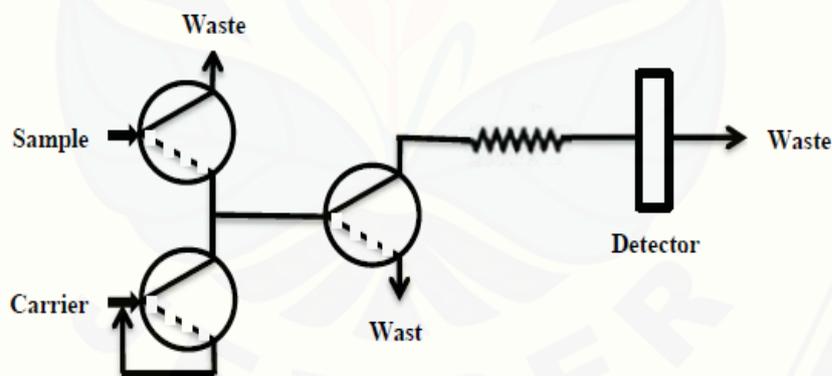
2.4 Multi-commutation in Flow Injection Analysis

Multi-commutation in Flow Injection Analysis (MCFIA) adalah metode modifikasi dari sistem alir FIA yang mengacu pada rancangan sistem kendali oleh komputer. Metode MCFIA menggunakan perangkat katup solenoid tiga arah yang dapat diatur sebagai jaringan aliran secara manual ataupun dikontrol menggunakan komputer dengan sebuah *software*. Katup solenoid tiga arah yang digunakan pada MCFIA dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2. 2 Katup solenoid tiga arah
(Cerdea dkk., 2014)

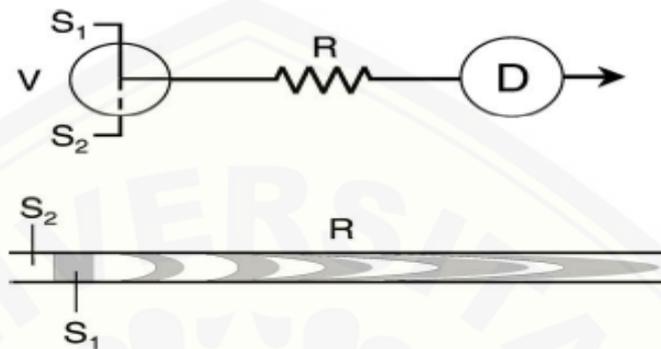
Sistem alir *multi-commutation* memberikan tingkat otomatisasi yang lebih tinggi dalam analisis aliran serta fleksibilitas yang tinggi. *Multi-commutation in Flow Injection Analysis* jauh lebih murah daripada sistem aliran konsep lain yang menunjukkan tingkat otomatisasi yang lebih tinggi, seperti analisis sekuensial injeksi (SIA) dan analisis aliran multisyringe (MSFIA) (Lara-ortega dkk., 2018). Model sistem alir *Multi-commutation* menggunakan katub solenoid tiga arah dapat ditunjukkan pada gambar 2.3.



Gambar 2. 3 Sistem *Multi-commutation*
(Pramauro dkk., 1996)

Potensi utama sistem alir *Multi-commutation* yaitu pembentukan dua aliran. Sejumlah cairan dapat dimasukkan dalam *manifold* secara cepat dan berurutan. Cairan biasanya diinjeksikan melalui katub yang dikendalikan oleh komputer, selanjutnya akan mengalami pencampuran secara cepat saat diangkut pada aliran (Rocha dkk., 2002). Pencampuran sampel dengan reagen dalam aliran terjadi terutama disebabkan oleh proses difusi terkontrol dan terjadi reaksi kimia.

Detektor secara kontinyu merekam parameter absorban, spektrofotometri atau parameter-parameter fisik lainnya sebagai hasil yang diterima dari perubahan sampel setelah aliran terjadi (Christian, 1989). Pembentukan aliran pada sistem alir *Multi-commutation* dapat dilihat pada gambar 2.4.



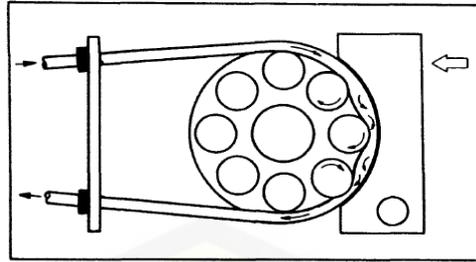
Gambar 2. 4 Pembentukan aliran pada *reaction coil*. S_1 dan S_2 : larutan; V: *three way solenoid valve*; R: *reaction coil*; D: detektor (Rocha dkk., 2002)

2.4.1 Instrumentasi *Multi-commutation* FIA

Sistem alir *Multi-commutation* FIA terdiri dari empat komponen utama, yaitu: unit penggerak, unit transportasi, unit injeksi dan *reaction unit/mixing reaction*, dan detektor. Komponen pendukungnya yaitu komputer yang mengatur jalannya sampel, mikrokontroler (Arduino Uno) perekaman data dari detektor dan perhitungan hasil analisis. Berikut ini adalah komponen-komponen dalam sistem alir *Multi-commutation* FIA:

1. Unit penggerak

Unit penggerak adalah suatu unit yang berfungsi menggerakkan cairan ke unit-unit yang lain dalam sistem alir FIA dengan kecepatan (*flow rate*) yang konstan dan bebas dari denyut atau gangguan selama aliran berlangsung (*pulse-free*). Unit ini biasanya berupa pompa peristaltik, pompa syringe, dan botol bertekanan tinggi atau diletakkan dengan ketinggian tertentu. Pompa peristaltik memiliki prinsip kerja berdasarkan tekanan dan perpindahan. Pompa peristaltik harus didukung suatu pipa elastis untuk menggerakkan cairan. Pipa-pipa ini ditekan oleh beberapa pemutar yang berputar dan menekan secara bergantian, dengan cara ini cairan yang berada dalam pipa dapat digerakkan (Kalrberg dan Pacey, 1989). Gambar pompa peristaltik dapat dilihat pada gambar 2.5.



Gambar 2. 5 Pompa Peristaltik
(Kalrberg dan Pacey, 1989)

2. Unit transportasi

Unit transportasi memiliki beberapa fungsi yaitu sebagai tempat mengalirnya sampel, tempat terjadinya pencampuran, larutan pembawa dan reagen serta menghubungkan bagian satu dengan bagian lainnya dalam FIA. Unit transportasi adalah unit yang berbentuk pipa. Pipa yang digunakan dalam unit ini memiliki ukuran internal diameter dalam range 0,1–2 mm, namun yang sering digunakan adalah 0,3; 0,5 dan 0,7 mm yang masing-masing digunakan untuk menghasilkan dispersi yang rendah, sedang dan tinggi. Material pipa ini dapat berupa PVC, silikon atau plastik lainnya. Komponen penting dalam transport unit yang lain adalah reaktor. Reaktor dalam FIA dapat dikategorikan sebagai *open tube*, *coil and packed reactor*, *single bed string reactor* (SBSR), dan *mixing chamber*.

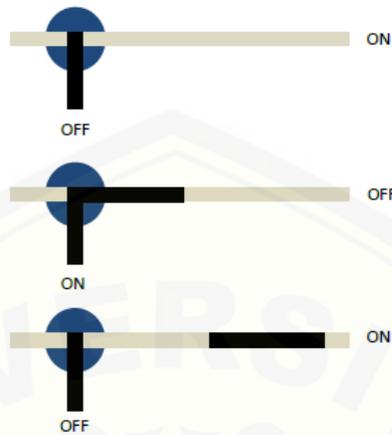
3. Unit Injeksi

Unit injeksi bertugas untuk memasukkan sampel dengan volume tertentu ke dalam aliran *carrier* dengan ketentuan sebagai berikut:

- 1) Sampel yang dimasukkan dalam volume yang akurat dan *reproduksibel*.
- 2) Sampel harus masuk dalam aliran *carrier* sedemikian rupa sehingga tidak mengganggu jalannya aliran tersebut.
- 3) Operasi injeksi harus cepat dan kalau mungkin dapat dikontrol secara elektronik.

Unit injeksi yang digunakan dalam sistem *Multi-commutation* yaitu *three-way solenoid valve* atau sering disebut katup solenoid 3 arah yang memiliki 1 lubang *inlet*, 1 lubang *outlet* dan 1 lubang pembuangan. Katup solenoid 3 arah pada sistem *Multi-commutation* dapat diubah menjadi 2 lubang inlet dan 1 lubang

outlet atau sebaliknya (Pramauro dkk., 1996). Sistem kerja *three-way solenoid valve* dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2. 6 Sistem kerja *three-way solenoid valve* (Pramauro dkk., 1996)

4. Detektor

Detektor yang digunakan dalam FIA idealnya memiliki keistimewaan diantaranya: kecilnya volume *flow-cell*, *noise* rendah, *flow rate independent signal*, respon yang cepat dan linear dalam daerah konsentrasi yang lebar dan sensitivitasnya tinggi. Kriteria utama detektor FIA adalah cepat tanggap karena lebar puncak dari FIA hanya beberapa detik saja, maka detektor dan perangkat elektroniknya harus mempunyai waktu tanggap kurang dari satu detik. Beberapa detektor dalam sistem FIA yaitu amperometer, penyerap atom, luminisensi kimia, fluorometer, potensiometer, pH meter, elektroda membran ion selektif, dan spektrofotometer (Sukarti, 1998).

5. Arduino Uno

Arduino Uno adalah papan mikrokontroler yang berdasarkan ATmega328 yang memiliki 14 digital input atau output pin (dimana 6 digital input atau output pin dapat digunakan sebagai output PWM), 6 input analog, osilator kristal 16 MHz, koneksi USB, jack listrik, header ICSP, dan tombol *reset*. Arduino Uno juga berisikan semua yang diperlukan untuk mendukung mikrokontroler, dengan cara menghubungkannya ke komputer dengan kabel USB atau power dengan adaptor AC-DC atau baterai untuk memulai. Arduino Uno berfungsi sebagai pengontrol *three-way solenoid valve* dengan pemrograman

menggunakan komputer (Sari dkk., 2015). Bentuk fisik dari Arduino Uno dapat dilihat pada gambar 2.7.



Gambar 2. 7 Modul Mikrokontroler Arduino Uno (Ardian, 2013)

Software Arduino Uno yang digunakan adalah *driver* dan IDE, walaupun masih ada beberapa *software* lain yang sangat berguna selama pengembangan arduino. *Integrated Development Environment* (IDE), suatu program khusus untuk suatu komputer agar dapat membuat suatu rancangan atau sketsa program untuk papan arduino. IDE arduino merupakan *software* yang sangat canggih ditulis dengan menggunakan java. IDE arduino terdiri dari :

1. Editor program sebuah window yang memungkinkan pengguna menulis dan mengedit program dalam bahasa *processing*.
2. *Compiler* Berfungsi untuk kompilasi *sketch* tanpa unggah ke *board* bisa dipakai untuk pengecekan kesalahan kode sintaks *sketch*. Sebuah modul yang mengubah kode program menjadi kode biner bagaimanapun sebuah mikrokontroler tidak akan bisa memahami bahasa *processing*.
3. *Uploader* berfungsi untuk mengunggah hasil kompilasi *sketch* ke *board* target. Pesan *error* akan terlihat jika *board* belum terpasang atau alamat port COM belum terkonfigurasi dengan benar. Sebuah modul yang memuat kode biner dari komputer ke dalam memori di dalam papan arduino

(B. Gustomo, 2015).

Kelebihan Arduino dari *platform hardware* mikrokontroler lain adalah:

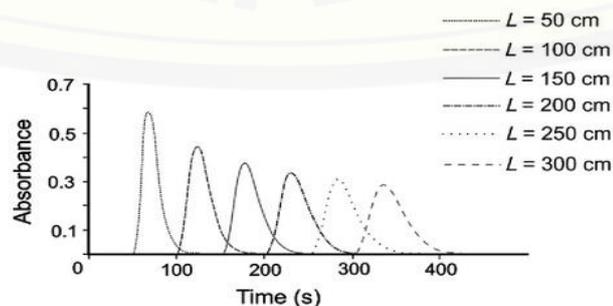
1. IDE arduino merupakan multiplatform yang dapat dijalankan di berbagai sistem operasi, seperti Windows, Macintosh dan Linux.

2. IDE arduino dibuat berdasarkan pada IDE *processing* yang sederhana sehingga mudah digunakan.
3. Pemrograman arduino menggunakan kabel yang terhubung dengan port USB, bukan port serial. Fitur ini berguna karena banyak komputer yang sekarang ini tidak memiliki port serial.
4. Arduino adalah *hardware* dan *software open source*, pembaca bisa mendownload *software* dan gambar rangkaian arduino tanpa harus membayar pada pembuat arduino.
5. Biaya *hardware* cukup murah.
6. Proyek arduino ini dikembangkan dalam lingkungan pendidikan, sehingga bagi pemula akan lebih cepat dan mudah mempelajarinya.
7. Memiliki begitu banyak pengguna dan komunitas di internet yang dapat membantu setiap kesulitan yang dihadapi (Artanto, 2012).

2.4.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Analisis Sistem Alir

a) Panjang reaktor

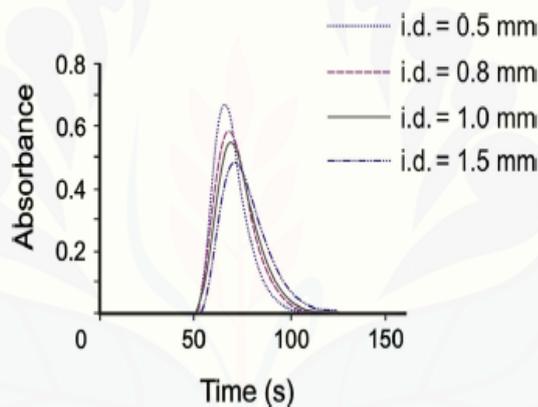
Panjang reaktor dipengaruhi oleh reaksi yang terjadi pada sistem alir. Panjang reaktor semakin panjang maka sampel akan mengalami jarak tempuh yang lebih jauh menuju detektor sehingga sampel akan banyak mengalami proses dispersi. Gambar 2.8 menunjukkan semakin panjang reaktor maka proses dispersi akan meningkat sehingga puncak yang dihasilkan lebar dan rendah sedangkan semakin pendek reaktor maka proses dispersi semakin sedikit sehingga puncak yang dihasilkan runcing dan tinggi (Cerde dkk., 2014).



Gambar 2. 8 Pengaruh panjang reaktor terhadap proses dispersi (Cerde dkk., 2014)

b) Diameter pipa

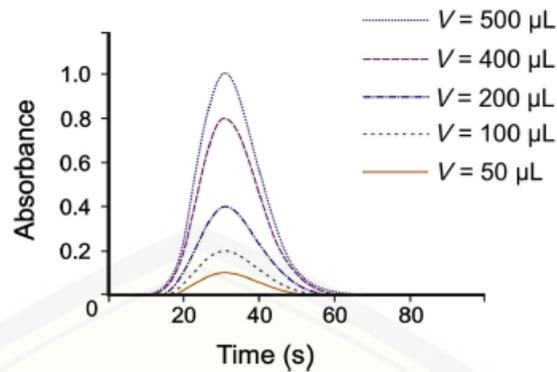
Diameter pipa mempengaruhi puncak yang dihasilkan. Lebar dan tinggi puncak merupakan fungsi dari jari-jari pipa yaitu, semakin besar jari-jarinya maka lebar puncak meningkat dan tinggi puncak menurun. Pipa dengan diameter kecil menyebabkan penurunan dispersi disebabkan oleh waktu TR yang rendah. Nilai kontribusi dapat diamati pada gambar 2.9 bahwa semakin besar nilai kontribusi difusi maka terjadi peningkatan pada nilai TR. Gambar 2.9 menunjukkan bahwa semakin besar diameter pipa maka proses dispersi semakin meningkat sehingga puncak yang dihasilkan semakin lebar dan rendah, apabila diameter pipa semakin kecil maka proses dispersi semakin menurun dan puncak yang dihasilkan semakin runcing dan tinggi (Cerda dkk., 2014).



Gambar 2. 9 Pengaruh diameter pipa terhadap proses dispersi (Cerda dkk., 2014)

c) Injeksi Volume

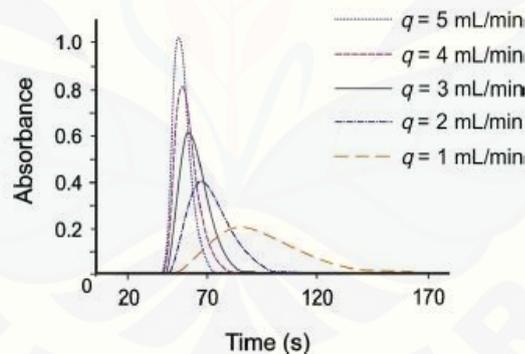
Jumlah volume yang diinjeksikan mempengaruhi tinggi puncak, semakin banyak volume injeksi semakin tinggi puncak yang dihasilkan. Gambar 2.10 menunjukkan bahwa semakin banyak volume sampel yang di injeksi maka puncak yang dihasilkan semakin tinggi, apabila volume sampel yang di injeksi sedikit maka puncak semakin kecil (Cerda dkk., 2014).



Gambar 2. 10 Pengaruh injeksi volume terhadap proses dispersi (Cerda dkk., 2014)

d) Laju Alir

Efek laju alir juga berpengaruh pada proses dispersi, dispersi berkurang dengan meningkatnya laju alir. Gambar 2.11 menunjukkan semakin besar laju alir maka proses dispersi semakin rendah sehingga menghasilkan puncak yang runcing, sedangkan semakin kecil laju alir maka proses dispersi semakin meningkat sehingga puncak yang terbentuk menjadi lebar dan rendah (Cerda dkk., 2014).



Gambar 2. 11 Pengaruh laju alir terhadap proses dispersi (Cerda dkk., 2014)

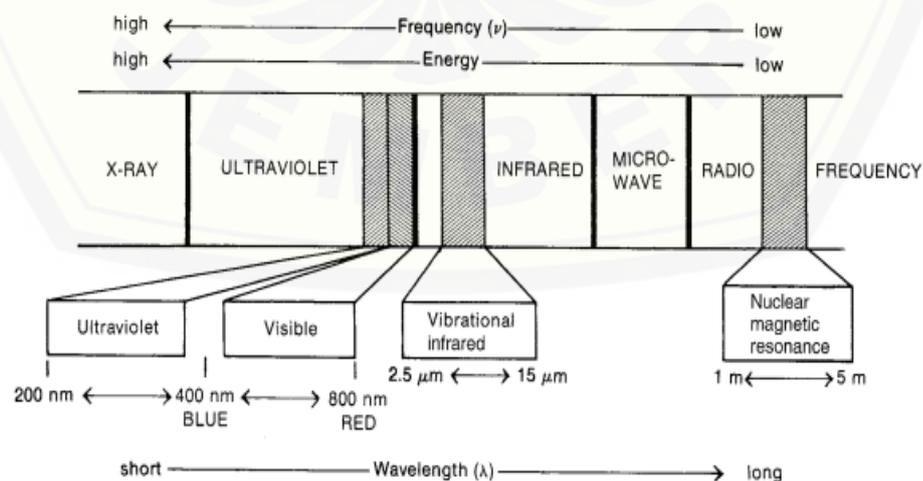
2.5 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrometer merupakan piranti yang menghasilkan spektrum sinar dengan panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer merupakan piranti yang digunakan untuk cahaya yang melewati suatu sampel, sedangkan sinar tampak (Visibel) merupakan spektrum radiasi yang dihasilkan oleh alat spektrofotometer itu sendiri. Spektrofotometri Visibel digunakan untuk menentukan konsentrasi, panjang gelombang serapan maksimum (λ_{maks}) dan nilai absorbansi atau

transmitansi sinar pada pengukuran intensitas sampel larutan. Hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer merupakan fungsi absorbansi atau transmitansi terhadap panjang gelombang sinar (Basset dkk., 1994).

Spektrofotometer terdapat sumber cahaya berupa lampu (Tungsten, Deutrium atau Wolfram), kolimator untuk memotong sinar yang menyebar, prisma berfungsi untuk menyeleksi spektrum cahaya atau dapat juga menggunakan grating atau kisi. Spektrofotometer juga terdapat kuvet untuk wadah sampel sedangkan blanko sebagai pembanding dan detektor cahaya (fotometer) untuk menangkap cahaya yang ditransmisikan oleh sampel. Cahaya yang diseleksi oleh prisma atau grating dilewatkan pada sampel dan blanko kemudian ditangkap oleh fotometer berupa intensitas cahaya. Perbandingan intensitas cahaya yang melewati sampel dan blanko disebut sebagai transmitansi cahaya yang disebutkan pada hukum Lambert-Beer (Khopkar, 1990)

Metode yang digunakan pada spektrofotometer disebut spektrofotometri, yaitu pengukuran besarnya penyerapan sinar pada panjang gelombang tertentu. Penyerapan sinar terjadi apabila elektron diberikan suatu energi yang cukup untuk berpindah dari keadaan *ground state* menuju ke keadaan tereksitasi akibat adanya pancaran radiasi dari sumber sinar dengan panjang gelombang tertentu (Day dan Underwood, 1999). Gambar 2.12 adalah gambar daerah dari beberapa spektrum elektromagnetik.



Gambar 2. 12 Spektrum Elektromagnetik (Pavia dkk., 2001)

Sinar tampak (visibel) mempunyai panjang gelombang antara 400-800 nm. Spektrofotometri visibel memiliki warna yang dapat dihubungkan dengan panjang gelombang. Sinar putih mengandung radiasi pada semua panjang gelombang di daerah sinar tampak dan warna-warna yang dapat dihubungkan dengan panjang gelombang ini digunakan untuk menandai bagian-bagian dari spektrum tertentu seperti terlihat pada table 2.1.

Tabel 2. 1 Spektrum sinar tampak dan warna-warna komplementernya

Panjang gelombang (nm)	Warna yang diserap	Warna komplementer
400-435	Violet	Kuning-hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-biru	Orange
490-500	Biru-hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning-hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Orange	Hijau-biru
610-750	Merah	Biru-hijau

(Day dan Underwood, 2002).

Pengukuran komponen secara spektrofotometri menggunakan hukum dasar yaitu Hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer mengemukakan tentang serapan sinar atau energi radiasi oleh spesies kimia secara kuantitatif. Suatu berkas sinar polikromatis (cahaya putih) dilewatkan pada suatu objek maka akan terjadi refleksi, absorpsi atau transmisi oleh objek. Suatu radiasi elektromagnetik jika dikenakan pada suatu larutan dengan intensitas radiasi semula (I_0), maka sebagian radiasi tersebut akan diteruskan (I_t), dipantulkan (I_r), dan diabsorpsi (I_a).

$$I_0 = I_t + I_a + I_r \dots \dots \dots (2.1)$$

Harga I_r ($\pm 4\%$) dengan demikian dapat diabaikan karena pada metode spektrofotometri UV-Vis dipakai larutan pembanding sehingga:

$$I_0 = I_t + I_a \dots\dots\dots(2.2)$$

Bouger, Lambert dan Beer membuat rumus secara matematik hubungan antara transmittan atau absorban terhadap intensitas radiasi atau konsentrasi zat yang dianalisis dan tebal larutan yang mengabsorpsi sebagai berikut:

$$T = I_t / I_0 = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot b} \dots\dots\dots(2.3)$$

$$A = \text{Log } 1/T = \epsilon \times c \times b \dots\dots\dots(2.4)$$

Keterangan: T = Persen transmittan

I_0 = Intensitas radiasi yang datang

I_t = Intensitas radiasi yang diteruskan

ϵ = Adsorptivitas molar ($\text{L} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c = Konsentrasi (mol/L)

b = Tebal larutan (cm)

A = Absorban

(Mulja, 1995).

2.6 Software LabVIEW

LabVIEW (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*) adalah perangkat lunak yang khusus untuk pemrosesan dan visualisasi data dalam bidang akuisisi data, kendali dan instrumentasi serta otomatisasi industri. Fungsi-fungsi yang digunakan dalam perancangan sistem ini yaitu:

- a. Komunikasi serial adalah bagian penting yang digunakan untuk interaksi arduino dengan LabVIEW.
- b. *Graph* sebagai bahasa pemrograman visual, LABVIEW memberikan kemudahan dan handal dalam pembuatan grafiknya. *Graph* yang dipakai pada perancangan ini yaitu *Waveform Chart* yang menampilkan data yang diterima pada laju konstan dengan cara menambahkan titik data setiap waktu ke grafik

(Sari dkk., 2015).

LabVIEW banyak digunakan karena memiliki kelebihan. Beberapa kelebihan LabVIEW antara lain :

1. Pembuatan program di LabVIEW jelas dan mudah dipahami, karena berbentuk grafis, dengan instruksi berbentuk ikon-ikon, yang dihubungkan dengan garis untuk menunjukkan aliran data, mirip *flowchart*.
2. Pembuatan program yang mudah, yaitu hanya dengan menarik keluar ikon instruksi yang sudah tersedia di palet (kotak instruksi), dan menghubungkannya dengan garis ke ikon lain. Garis ini sama seperti variabel pada bahasa pemrograman teks. LabVIEW menyederhanakan pembuatan program, karena garis tersebut hanya akan terhubung apabila tipe datanya sesuai sehingga menghilangkan kebutuhan manajemen memori dan deklarasi tipe data setiap variabel seperti dalam bahasa pemrograman teks. Pengguna juga tidak perlu mengingat nama instruksi, karena semua ditampilkan pada palet.
3. Mempersingkat waktu pembuatan program karena mudah dipahami dan mudah dibuat.
4. LabVIEW didesain sebagai sebuah bahasa program paralel (*multicore*) yang mampu menangani beberapa instruksi sekaligus dalam waktu bersamaan. Hal ini sangat sulit dilakukan dalam bahasa program teks, karena biasanya bahasa program teks mengeksekusi instruksinya secara berurutan per baris, satu demi satu. Pengguna LabVIEW dapat membuat aplikasi eksekusi paralel ini secara mudah dengan menempatkan beberapa struktur *loop* secara terpisah dalam *block* diagram.
5. Sifat modular LabVIEW memungkinkan pengguna untuk membuat program yang kompleks dan rumit menjadi sederhana, yaitu dengan cara membuat subprogram, atau di LabVIEW disebut subVI. Ikon-ikon dalam LabVIEW sebenarnya merupakan subVI. Beberapa subVI dapat digabungkan menjadi sebuah subVI. SubVI-subVI gabungan tersebut dapat digabungkan lagi menjadi sebuah subVI lain, demikian seterusnya dengan tingkat hirerarki yang tidak terbatas

(Artanto, 2012).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Oktober 2019 – Oktober 2020.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

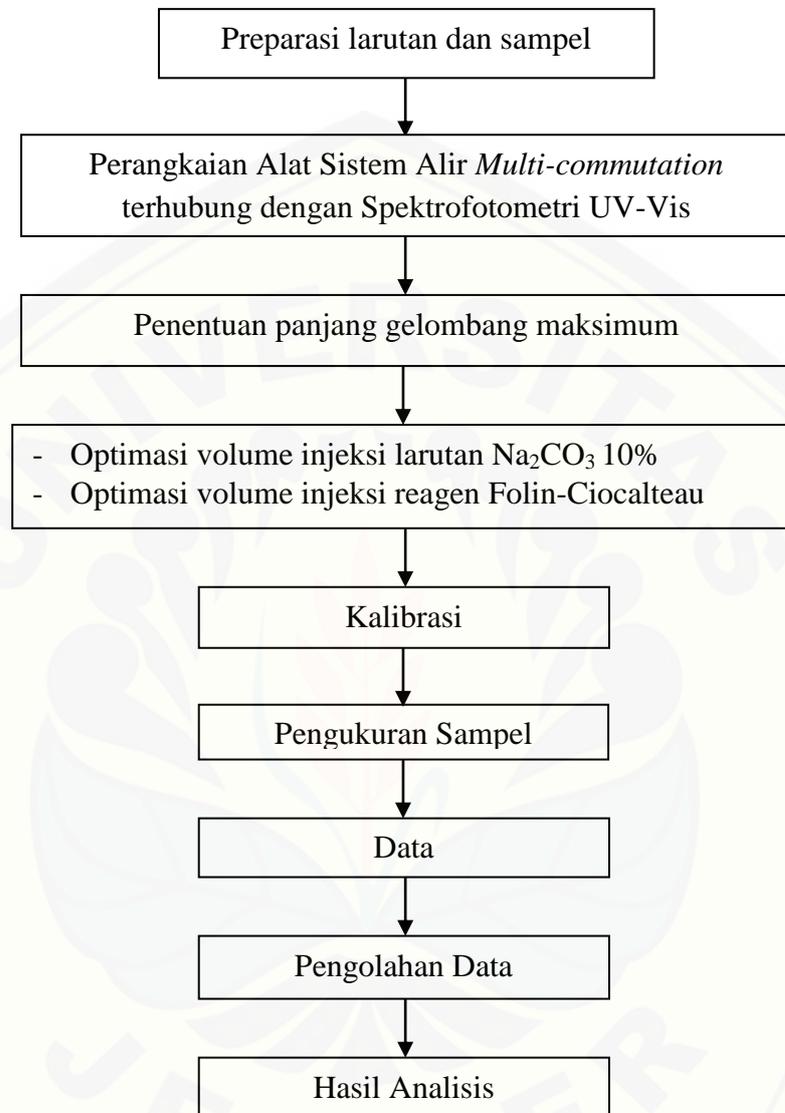
Peralatan yang akan digunakan dalam preparasi meliputi gelas ukur 10 mL, gelas kimia 50 mL, batang pengaduk, spatula, pipet tetes, pipet mohr 10 mL, labu ukur 10 mL dan 100 mL, ball pipet, botol semprot, kaca arloji, dan neraca analitik. Peralatan yang akan digunakan dalam perangkaian alat meliputi komputer (Software labview 2018), Arduino Uno ATmega328P, *three way solenoid valve* merk Bio-chem, *relay 4 channel 5 Volt DC*, *power supply 5 Volt & 12 Volt*, kabel pelangi, pompa peristaltik, *tubing coil 0,8 mm*, *webcam* merk Havit HV-V622 8MP, dan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu madu tanpa merk, madu merk “Madu Rasa”, madu murni, akuades, asam galat sigma aldrich ($C_7H_6O_5$) (pa), natrium karbonat (Na_2CO_3) 10%, dan reagen Folin-Ciocalteu merk jerman (pa).

3.3 Diagram Alir

Diagram alir dalam penelitian ini ditunjukkan pada gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Diagram analisis polifenol total pada madu dengan metode sistem alir *Multi-commutation* menggunakan spektrofotometri UV-Vis

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi larutan dan sampel

a. Preparasi larutan baku asam galat 1000 ppm

Asam galat ditimbang sebanyak 0,1 g dan dilarutkan dengan sedikit akuades. Larutan tersebut diaduk, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

b. Preparasi larutan standar asam galat

Larutan standar asam galat dibuat dengan mengencerkan larutan baku pada labu ukur 100 mL dengan akuades. Larutan baku diambil 0,1,3,5,7,9 ml dan diencerkan sampai 100 ml untuk membuat variasi konsentrasi larutan standar yang digunakan yaitu 0 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, dan 90 ppm.

c. Preparasi larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 10%

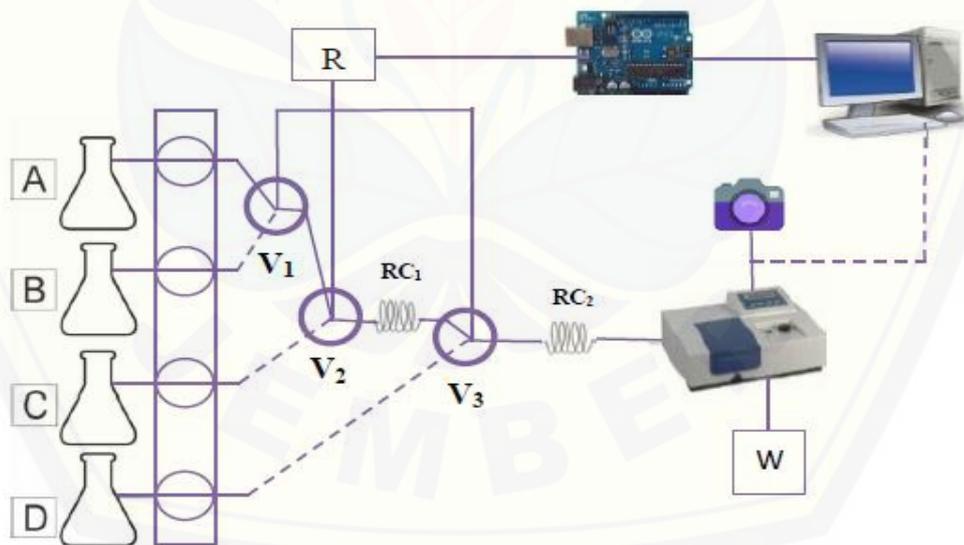
Natrium karbonat ditimbang sebanyak 10 gram, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

d. Preparasi sampel

Sampel madu diambil sebanyak 1 mL. Sampel madu dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Madu diencerkan sampai tanda batas.

3.4.2 Skema alat

Perangkaian alat sistem alir *multi-commutation* yang terhubung dengan detektor spektrofotometri UV-Vis dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3. 2 Desain instrumentasi analisis polifenol pada madu

- Keterangan: A = *carier* (H_2O)
 B = sampel madu atau larutan standar asam galat
 C = larutan natrium karbonat 10%
 D = reagen Folin-Ciocalteu

$V_1, V_2, V_3 = \text{valve}$
 $RC_1, RC_2 = \text{reaction coil}$
 $R = \text{relay}$
 $W = \text{limbah}$



Gambar 3. 3 Model sistem aliran *Multicommutation*

3.4.3 Prosedur sistem alir *Multi-commutation*

Three way valve solenoid (V_1, V_2, V_3) ketika dalam keadaan mati, maka akan menarik *carier* menuju detektor dan akan menghasilkan *baseline*. *Three way valve solenoid* secara bergantian diaktifkan dimana V_1 untuk sampel atau larutan standar asam galat, V_2 untuk larutan natrium karbonat 10%, dan V_3 untuk reagen Folin-Ciocalteu. Waktu pergantian V_1, V_2, V_3 dilakukan sesuai model aliran pada gambar 3.3. Pembacaan sinyal dimulai dengan pembentukan produk dari hasil sampel atau larutan standar asam galat dengan larutan natrium karbonat 10% dan reagen Folin-Ciocalteu, setelah semua *valve solenoid* dimatikan maka *carier* akan mengalir terus menerus untuk menggantikan semua larutan yang telah dialirkan sebelumnya.

3.4.4 Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum diperlukan untuk memperoleh hasil absorbansi yang maksimum pada pengukuran kadar senyawa polifenol menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan larutan asam galat 500 ppm. Larutan asam galat 500 ppm sebanyak 100 μL kemudian ditambahkan larutan Na_2CO_3 10% dan reagen Folin-Ciocalteu masing-masing 100 μL dan ditambahkan akuades sampai 10 mL. Larutan tersebut kemudian diukur pada panjang gelombang antara 600-750 nm dengan interval 10 nm. Setelah diperoleh panjang

gelombang maksimum maka rentang intervalnya diperkecil menjadi 2 nm dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

3.4.5 Penentuan volume larutan Na_2CO_3 10%

Larutan asam galat yang telah dibuat dengan konsentrasi 500 ppm dialirkan sebanyak 100 μL dengan laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Larutan Na_2CO_3 10% diinjeksikan sebanyak 75 μL pada katub selenoid yang kedua, kemudian injeksikan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 100 μL pada katub selenoid yang ketiga. Volume injeksi larutan Na_2CO_3 selanjutnya divariasikan menjadi 100 μL , 125 μL , 150 μL , dan 175 μL . Penentuan volume larutan Na_2CO_3 diukur dengan panjang gelombang maksimum hasil pengukuran sebelumnya. Tentukan volume injeksi yang paling optimum.

3.4.6 Penentuan volume reagen Folin-Ciocalteu

Optimasi volume injeksi reagen Folin-Ciocalteu dilakukan dengan menggunakan larutan asam galat 500 ppm sebanyak 100 μL . Larutan diukur dengan laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Larutan Na_2CO_3 10% diinjeksikan dengan volume optimum sesuai hasil percobaan sebelumnya, kemudian injeksikan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 75 μL pada katub selenoid yang ketiga. Aliran dilanjutkan hingga bertemu dengan sampel madu. Larutan diukur dengan panjang gelombang maksimum. Variasi volume injeksi reagen Folin-Ciocalteu divariasikan menjadi 100 μL , 125 μL , 150 μL , dan 175 μL . Tentukan volume injeksi yang paling optimum.

3.4.7 Pembuatan kurva kalibrasi asam galat

Pengukuran absorbansi larutan standar dengan variasi konsentrasinya dilakukan pada laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$ dan panjang gelombang maksimum serta volume injeksi larutan Na_2CO_3 10% dan reagen Folin-Ciocalteu yang optimum. Variasi konsentrasi larutan standar yang digunakan adalah 0, 10, 30, 50, 70, dan 90 ppm asam galat. Nilai absorbansi yang telah diperoleh kemudian digunakan untuk kurva kalibrasi antara konsentrasi larutan standar dengan absorbansi. Kurva kalibrasi yang diperoleh akan menghasilkan persamaan regresi ($y = mx + c$) yang digunakan sebagai penentuan kadar polifenol pada madu.

3.4.8 Pengukuran sampel

Sampel dialirkan sebanyak 100 μL dan diukur dengan laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$, menggunakan panjang gelombang maksimum, volume optimasi larutan Na_2CO_3 10% dan reagen Folin-Ciocalteu. Sampel dialirkan menuju ke detektor yang berupa spektrofotometer UV-Vis untuk menghasilkan data yang akan ditampilkan oleh komputer.

3.4.9 Karakteristik data

Kerja dari suatu alat dapat diketahui baik atau tidaknya dengan mengevaluasi karakteristiknya meliputi linieritas, sensitivitas, limit deteksi, dan repeatabilitas.

a. Linieritas

Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat suatu persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasinya. Nilai absorbansi yang diperoleh tiap konsentrasi dirata-rata dan dibuat persamaan garisnya dengan metode regresi linier ($y = mx + c$). Nilai *slope* atau kemiringan (m), intersep (c) dan sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) yang menggambarkan linieritasnya (Ermer dan Miller, 2005). Hubungan linier yang dapat diterima adalah $>0,9970$, sedangkan nilai ideal jika $r = +1$ atau $r = -1$ menunjukkan jika hubungan antara kedua peubah sangat erat, sedangkan nilai r yang mendekati nol menggambarkan hubungan antara peubah tidak linier. Nilai regresi yang diperoleh kurang dari 0,9970, maka konsentrasi larutan standar yang digunakan diubah-ubah sampai menemukan regresi yang dapat diterima (Riyanto, 2014)

b. Sensitivitas

Nilai sensitivitas diperoleh dari menganalisa persamaan garis dari kurva kalibrasi antara variasi kadar asam galat dengan respon detektor yang akan ditunjukkan dari *slope* (m) atau kemiringan kurva kalibrasi tersebut. Nilai sensitivitas yang benar menunjukkan bahwa perubahan kadar yang kecil dari asam

galat memberikan nilai absorbansi yang berarti sehingga dapat diperoleh respon detektor yang sangat sensitif.

c. Limit Deteksi

Limit deteksi dapat ditentukan dengan cara pengukuran larutan blanko untuk memperoleh nilai absorbansi dengan panjang gelombang maksimum sebanyak 10 kali pengulangan. Berdasarkan senyawa yang diukur dapat dicari standar deviasinya (SD) untuk menentukan Y_{LOD} , kemudian disubstitusikan ke persamaan kurva kalibrasi sehingga didapatkan konsentrasi dari limit deteksi tersebut. Rumus penentuan limit deteksi sebagai berikut :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad \text{Persamaan 3.1}$$

$$Y_{LOD} = Y_B + 3 SD \quad \text{Persamaan 3.2}$$

$$X_{LOD} = \frac{Y_{LOD} - c}{m} \quad \text{Persamaan 3.3}$$

Dimana SD adalah standar deviasi kurva kalibrasi, y adalah absorbansi blanko, \bar{y} adalah absorbansi rata-rata blanko, n = jumlah pengulangan Y_{LOD} adalah limit deteksi, Y_B adalah rata-rata absorbansi, X_{LOD} adalah konsentrasi limit deteksi, c adalah intersep dan m adalah slope dari kurva kalibrasi (Ermer dan Miller, 2005).

d. Repeatabilitas

Repeatabilitas ditentukan dengan mengukur larutan standar asam galat. Setiap pengukuran dilakukan oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dengan tiga kali pengulangan dan dalam interval yang pendek. Keterulangan menunjukkan tingkat kesalahan pengukuran akibat pengulangan.

$$K_v = \left[\frac{SD}{\bar{x}} \right] \times 100 \% \quad \text{Persamaan 3.3}$$

Dimana : K_v = koefisien variasi

SD = standart deviasi

\bar{x} = absorbansi rata-rata sampel

(Harmita, 2004).

e. Uji perolehan kembali (*Recovery*)

Uji ini diawali dengan pengukuran sampel dari analit dan ditentukan konsentrasi sampelnya. Sampel kemudian ditambahkan dengan larutan baku analit dengan perbandingan 1 : 1 sebagai konsentrasi total sampel, kemudian dianalisis dan ditentukan konsentrasi total sampel. Perhitungan perolehan kembali dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{C_F - C_A}{C_A^*} \times 100\% \quad \text{Persamaan 3.4}$$

Keterangan: C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C_A^* = konsentrasi analit yang ditambahkan

(Harmita, 2004).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka dapat ditarik beberapa kesimpulan, yaitu sebagai berikut:

1. Volume injeksi berpengaruh terhadap nilai absorbansi yang dihasilkan, sehingga volume optimum untuk larutan natrium karbonat 10% dan reagen Folin-Ciocalteu yang diinjeksikan yaitu masing-masing sebesar 150 μ L dan 125 μ L dengan menghasilkan nilai absorbansi tertinggi.
2. Hasil analisis data penentuan polifenol dengan metode analisis sistem alir *multi-commutated flow injection analysis* diperoleh linieritas dari persamaan $y = 0,0022x + 0,0465$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9985, sensitivitas sebesar 0,0022 absorbansi/ppm, limit deteksi sebesar 1,6 ppm, repeatabilitas kurang dari 2%, dan uji perolehan kembali (% *recovery*) untuk sampel madu tanpa merk, madu merk “Madu Rasa”, dan madu murni yaitu 120%, 89,2% dan 118%.
3. Kadar polifenol dalam madu tanpa merk menggunakan *Multi-Commutated Flow Injection Analysis* (MCFIA) dengan deteksi Spektrofotometri UV-Visibel sebesar 18,6 ppm, pada sampel madu merk “Madu Rasa” sebesar 43,3 ppm, sedangkan pada sampel madu murni sebesar 65,6 ppm.

5.2 Saran

Berdasarkan pengamatan terhadap hasil yang diperoleh, penelitian ini perlu dilakukan variasi sampel madu lebih banyak lagi sehingga dapat mengetahui kadar polifenol dalam berbagai jenis madu.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardian, W. 2013. *Alat Pengekstrak Kunyit Otomatis Berbasis Arduino Uno*. https://repository.usd.ac.id/267/2/115114014_full.pdf.
- Artanto, Dian. 2012. *Interaksi Arduino dan LabView*. Jakarta: PT Gramedia.
- B. Gustomo. 2015. *Pengenalan Arduino dan Pemrogramannya*. Bandung: Informatika Bandung.
- Basset, J., Denny, R. C. Jeffery, G. H., Mendham, J. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., dan Gallmann, P. 2008. Honey for Nutrition and Health. *American Journal of the College of Nutrition*. 27: 677–689.
- Cerda, V., Ferrer, L., Avivar, J., dan Cerda, A. 2014. *Flow Analysis A Practical Guide*. Poland: Elsevier.
- Chayati, I. 2008. Sifat Fisikokimia Madu Monoflora dari Daerah Istimewa Yogyakarta dan Jawa Tengah. *Jurnal Agritech*. 28(1): 9–14.
- Christian, G. D. 1989. *Analytical Chemistry*. Canada: John Willey and son inc.
- Day, R. A. dan Underwood, A.L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Jakarta: Erlangga.
- Ermer, J. dan Miller, J. H. McB. 2005. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*. Weinheim: Wiley-VchVerlag GmbH & Co.
- Gul, A. dan Pehlivan, T. 2018. Antioxidant Activities of Some Monofloral Honey Types Produced Across. *Saudi Journal of Biological Sciences*.25:1056–1065.

- Hakkinen, S. 2000. *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*. Kuopio: University of Kuopio.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. 1(3). Desember 2004. Departemen Farmasi MIPA UI. 117–135.
- Hikmah, Fajrin Nurul. 2019. Analisis Kadar Ion Amonium Nitrat Secara Simultan dengan Metode Sistem Alir *Multi-commutation* Potensiometer. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Huang, L., Liu, H., Zhang, B., dan Wu, D. 2015. Application of Electronic Nose with Multivariate Analysis and Sensor Selection for Botanical Origin Identification and Quality Determination of Honey. *Food Bioprocess Technol.* 359–370.
- Jibril, F. I., Hilmi, A. B. M., dan Manivannan, L. 2019. Isolation and Characterization of Polyphenols in Natural Honey for The Treatment of Human Diseases. *Bulletin of the National Research Centre*. 4(43): 1–9.
- Karlberg, B dan E. Pacey. Gil. 1989. *Flow Injection Analysis A Practical Guide*. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc.
- Kate, D. I. 2014. Penetapan Kandungan Fenolik Total dan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Pikrilhidrazil*) Ekstrak Metanolik Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa (Lour) Hallier F*). *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Kennedy, J. H. 1990. *Analytical Chemistry*. 2nd edition. New York: Sounders College Publishing.
- Khopkar, S. M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Lara-ortega, F. J., López, B. G., Cambra, M. B., dan Molina-díaz, A. 2018. Multicommutated Flow Injection Analysis Using Chemiluminescence Detection (MCFIA-CL) for Olive Oil Analysis. *Food Analytical Methods*.

- Leamsomrong, K., Suttajit, M., dan Chantiratikul, P. 2009. Flow Injection Analysis System for The Determination of Total Phenolic Compounds by Using Folin Ciocalteu Assay. *Asian Journal of Applied Sciences*. 2(2): 184-190.
- Mondong, Fendy R., Sangi, Meiske S., dan Kumaunang, Maureen. 2015. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia Prunifolia Jacq*) dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis (L.) Herbs*). *Jurnal MIPA UNSRAT*. 4(1): 81-87.
- Mulja, M. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
- Mulyono, T., Asnawati, dan Faruq, U. 2013. Desain Pompa Multi Syringe untuk Analisa Sistem Alir. *Jurnal Ilmu Dasar*. 14(1): 17–21.
- Muthi'ah, Zainab. 2016. Penentuan Kadar Fenolik Total dan Standardisasi Ekstrak Kulit Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan L*). *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Nurhayati., Siadi, K., dan Harjono. 2012. Pengaruh Konsentrasi Natriumbenzoat dan Lama Penyimpanan pada Kadar Fenolat Total Pasta Tomat. *Indonesian Journal of Chemical Science*. 1(2).
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., dan Kriz, G. S. 2001. *Introduction to Spectroscopy, 3rd Edition*. America: Thomson learning, Inc., United States of America.
- Pra Mauro, E., Pelizzetti, E., dan Weber, S. G. 1996. *Wilson and Wilson's Comprehensive analytical chemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Pyrzynska, K., dan Biesaga, M. 2009. Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids in Honey. *Trends in Analytical Chemistry*. 28(7): 893–902.
- Rahayu, C. 2012. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Kandungan Senyawa Total Polifenol dan Flavonoid Madu Paliasa Secara Spektrofotometri UV-Vis. *Skripsi*. Makassar: Universitas Hasanuddin.

Riyanto. 2014. *Validasi dan Verifikasi*. Yogyakarta: Deepublish.

Rocha, F. R. P., Reis, B. F., Zagatto, E. A. G., Lima, J. L. F. C., Lapa, R. A. S., dan Santos, J. L. M. 2002. Multicommutation in Flow Analysis : Concepts , Applications and Trends. *Analytica Chimica Acta*. 468: 199-131.

Saputri, D. S., dan Putri, Y. E. 2017. Aktivitas Antioksidan Madu Hutan di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Sumbawa Besar. *Jurnal Tambora*. 2(3).

Sari, T. P., Darwison, dan Aisuwarya, R. 2015. Sistem Monitoring Denyut Jantung Menggunakan Mikrokontroler Arduino dan Komunikasi Modul XBEE. *Jurnal*.1-9.

Smirnoff, N. 2005. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Iowa: Blackwell Publishing.

Sukarti, E. 1998. Teknik Analisis Suntik Alir Potensiometri dengan Elektrode Membran Ion Selektif. *Jurnal Ilmiah Widya Mandala*. (5): 002.

Ulfa, Siti Mariya. 2018. Penentuan Kadar Klorin Bebas Dalam Beras Menggunakan *Multi-commutated Flow Injection Analysis* (MCFIA) dengan Deteksi Spektrofotometri Visible. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.

Ustadi, Radiati, L. E., dan Thohari, I. 2017. Komponen Bioaktif pada Madu Karet (*Hevea Brasiliensis*) Madu Kaliandra (*Calliandra Callothyrsus*) dan Madu Randu (*Ceiba Pentandra*). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Hasil Ternak*. 12(2): 97-102.

LAMPIRAN

Lampiran 3. 1 Pembuatan Larutan Asam Galat

3.1.1 Pembuatan larutan baku asam galat 1000 ppm

Mr Asam galat ($C_7H_6O_5$) = 170,12 g/mol

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{L} = \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,1 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

3.1.2 Pembuatan larutan standar asam galat

a) 10 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$10 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 1000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = 1 \text{ mL}$$

b) 30 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$30 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 1000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = 3 \text{ mL}$$

c) 50 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$50 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 1000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = 5 \text{ mL}$$

d) 70 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 1000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = 7 \text{ mL}$$

e) 90 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$50 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 1000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = 9 \text{ mL}$$

3.1.3 Pembuatan Larutan Natrium Karbonat (Na_2CO_3) 10%

$$\text{Berat/volume}(10\%) = \frac{\text{gram Na}_2\text{CO}_3}{100 \text{ mL}} = \frac{10}{100} \times 100 \text{ mL} = 10 \text{ gram}$$

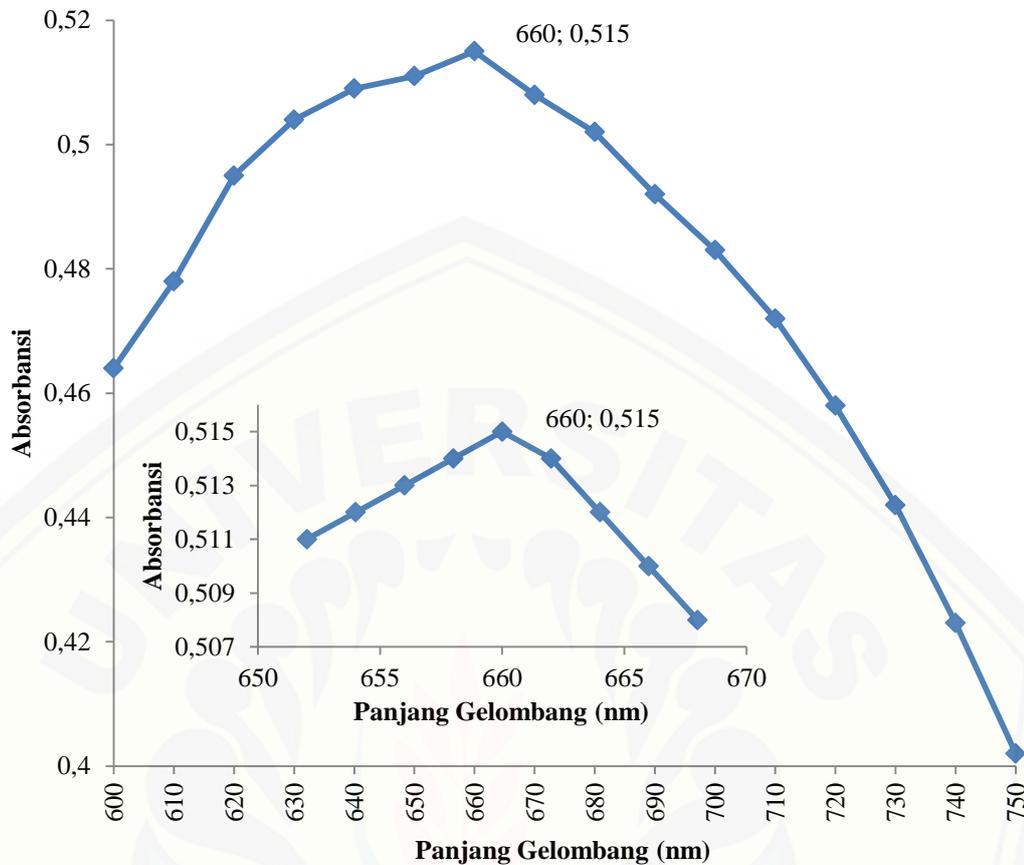
Lampiran 4. 1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Tabel 4.1.1 Data penentuan panjang gelombang maksimum dengan rentang 10 nm

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi			Rata-Rata
	P1	P2	P3	
600	0,464	0,464	0,464	0,464
610	0,478	0,478	0,478	0,478
620	0,495	0,495	0,495	0,495
630	0,504	0,504	0,504	0,504
640	0,509	0,509	0,509	0,509
650	0,511	0,511	0,511	0,511
660	0,515	0,515	0,515	0,515
670	0,508	0,508	0,508	0,508
680	0,502	0,502	0,502	0,502
690	0,492	0,492	0,492	0,492
700	0,483	0,483	0,483	0,483
710	0,472	0,472	0,472	0,472
720	0,458	0,458	0,458	0,458
730	0,442	0,442	0,442	0,442
740	0,423	0,423	0,423	0,423
750	0,402	0,402	0,402	0,402

Tabel 4.1.2 Data penentuan panjang gelombang maksimum dengan rentang 2 nm

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi			Rata-Rata
	P1	P2	P3	
652	0,511	0,511	0,511	0,511
654	0,512	0,512	0,512	0,512
656	0,513	0,513	0,513	0,513
658	0,514	0,514	0,514	0,514
660	0,515	0,515	0,515	0,515
662	0,514	0,514	0,514	0,514
664	0,512	0,512	0,512	0,512
666	0,510	0,510	0,510	0,510
668	0,508	0,508	0,508	0,508



Gambar 4.1 Profil serapan panjang gelombang maksimum kompleks *molybdenumblue* pada panjang gelombang 600-750 nm dengan interval 10 nm dan 2 nm

Lampiran 4. 2 Optimasi Volume Injeksi

Tabel 4.2.1 Hasil Optimasi Volume Injeksi Natrium Karbonat 10%

Volume Natrium Karbonat 10% (µL)	Absorbansi			
	P1	P2	P3	Rata-rata
75	0,673	0,675	0,682	0,677
100	0,725	0,733	0,723	0,727
125	0,853	0,868	0,864	0,862
150	0,953	0,955	0,953	0,954
175	0,662	0,652	0,657	0,657

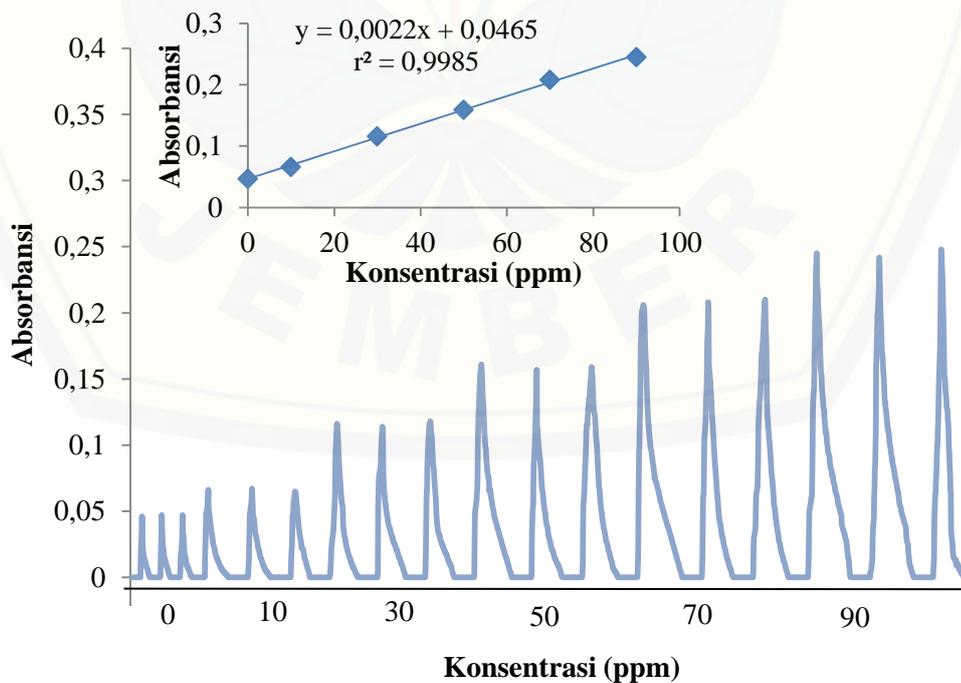
Tabel 4.2.2 Hasil Optimasi Volume Injeksi Reagen Folin-Ciocalteu

Volume Reagen Folin-Ciocalteu (μL)	Absorbansi			
	P1	P2	P3	Rata-rata
75	0,792	0,790	0,794	0,792
100	0,878	0,883	0,878	0,879
125	0,971	0,972	0,974	0,972
150	0,855	0,856	0,853	0,854
175	0,752	0,755	0,759	0,755

Lampiran 4. 3 Data Kurva Kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			
	P1	P2	P3	Rata-rata
0	0,046	0,047	0,47	0,0467
10	0,066	0,067	0,65	0,066
30	0,116	0,114	0,118	0,116
50	0,161	0,157	0,159	0,159
70	0,206	0,208	0,210	0,208
90	0,245	0,242	0,248	0,245

Gambar 4.2 Profil kurva kalibrasi larutan standar asam galat



Lampiran 4. 4 Perhitungan Limit Deteksi

Pengulangan	Absorbansi Blanko (Y)	[Y-Y ₁]	[Y-Y ₁] ²
1	0,045	-0,0023	5,29E-06
2	0,049	0,0017	2,89E-06
3	0,046	-0,0013	1,69E-06
4	0,047	-0,0003	9E-08
5	0,047	-0,0003	9E-08
6	0,048	0,0007	4,9E-07
7	0,047	-0,0003	9E-08
8	0,048	0,0007	4,9E-07
9	0,047	-0,0003	9E-08
10	0,049	0,0017	2,89E-06
Rata-rata (Y _B)	0,047		Σ = 0,000014

Pers. Kurva Kalibrasi $y = 0,0022x + 0,0465$

$$\begin{aligned}
 SD &= \sqrt{\frac{\sum [Y - Y_1]^2}{n - 1}} \\
 &= \sqrt{\frac{0,000014}{10 - 1}} \\
 &= 0,0012
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Pengukuran } Y_{LOD} &= Y_B + 3 SD \\
 &= 0,047 + 3 (0,0012) \\
 &= 0,047 + 0,0036 \\
 &= 0,050
 \end{aligned}$$

Konsentrasi limit deteksi

$$\begin{aligned}
 (X_{LOD}) &= \frac{Y_{LOD} - c}{m} \\
 &= \frac{0,050 - 0,0465}{0,0022} \\
 &= 1,6 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Jadi, konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi untuk metode *multi commutated flow injection analysis* yaitu 1,6 ppm.

Lampiran 4. 5 Perhitungan Keterulangan (*Repeatability*)

$$Kv = \left[\frac{SD}{\bar{x}} \right] \cdot 100\%$$

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - rata	SD	Kv (%)
	1	2	3			
0	0,046	0,047	0,047	0,0467	0,0005	1,2
10	0,066	0,067	0,065	0,066	0,001	1,5
30	0,116	0,114	0,118	0,116	0,002	1,7
50	0,161	0,157	0,159	0,159	0,002	1,2
70	0,206	0,208	0,210	0,208	0,002	0,9
90	0,245	0,242	0,248	0,245	0,003	1,2

Lampiran 4. 6 Perhitungan Konsentrasi Polifenol dalam Sampel

$$\text{Persamaan Kurva Kalibrasi } y = 0,0022x + 0,0465$$

4.6.1 Sampel madu tanpa merk

1. $y = 0,088$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,088 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,088 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,0415 = 0,0022x$
 $x = 18,8 \text{ ppm}$
2. $y = 0,086$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,086 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,086 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,0395 = 0,0022x$
 $x = 17,9 \text{ ppm}$
3. $y = 0,089$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,089 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,089 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,0425 = 0,0022x$
 $x = 19,3 \text{ ppm}$

Konsentrasi sampel madu tanpa merk (ppm)	FP	Konsentrasi semula	SD
18,8		188	0,709
17,9	10x	179	
19,3		193	
Rata-rata: 18,6		186	

4.6.2 Sampel madu merk “Madu Rasa”

1. $y = 0,142$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,142 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,142 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,0955 = 0,0022x$
 $x = 43,4 \text{ ppm}$
2. $y = 0,141$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,141 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,141 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,0945 = 0,0022x$
 $x = 42,9 \text{ ppm}$
3. $y = 0,143$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,143 = 0,0023x + 0,0463$
 $0,143 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,0965 = 0,0022x$
 $x = 43,8 \text{ ppm}$

Konsentrasi Sampel “Madu Rasa” (ppm)	FP	Konsentrasi semula	SD
43,4		434	0,451
42,9	10x	429	
43,8		438	
Rata-rata: 43,3		433	

4.6.3 Sampel madu murni

$$\begin{aligned}
 1. \quad y &= 0,191 \\
 y &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,191 &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,191 - 0,0465 &= 0,0022x \\
 0,1445 &= 0,0022x \\
 x &= 65,6 \text{ ppm} \\
 2. \quad y &= 0,193 \\
 y &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,193 &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,193 - 0,0465 &= 0,0022x \\
 0,1465 &= 0,0022x \\
 x &= 66,6 \text{ ppm} \\
 3. \quad y &= 0,189 \\
 y &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,189 &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,189 - 0,0465 &= 0,0022x \\
 0,1425 &= 0,0022x \\
 x &= 64,7 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Konsentrasi sampel madu murni (ppm)	FP	Konsentrasi semula	SD
65,6		656	0,950
66,6	10x	666	
64,7		647	
Rata-rata: 65,6		656	

Lampiran 4. 7 Uji Recovery

Perhitungan konsentrasi polifenol dalam campuran sampel dan larutan standar 50 ppm.

$$\text{Persamaan Kurva Kalibrasi } y = 0,0022x + 0,0465$$

4.7.1 Sampel madu tanpa merk + larutan standar 50 ppm

$$\begin{aligned}
 1. \quad y &= 0,135 \\
 y &= 0,0022x + 0,0465
 \end{aligned}$$

$$0,135 = 0,0022x + 0,0465$$

$$0,135 - 0,0465 = 0,0022x$$

$$0,0885 = 0,0022x$$

$$x = 40,2 \text{ ppm}$$

$$2. \quad y = 0,133$$

$$y = 0,0022x + 0,0465$$

$$0,133 = 0,0022x + 0,0465$$

$$0,133 - 0,0465 = 0,0022x$$

$$0,0865 = 0,0022x$$

$$x = 39,3 \text{ ppm}$$

$$3. \quad y = 0,132$$

$$y = 0,0022x + 0,0465$$

$$0,132 = 0,0022x + 0,0465$$

$$0,132 - 0,0465 = 0,0022x$$

$$0,0855 = 0,0022x$$

$$x = 38,8 \text{ ppm}$$

Konsentrasi sampel madu tanpa merk + standar (ppm)	SD
40,2	0,709
39,3	
38,8	
Rata-rata: 39,4	

$$\text{Sampel rata-rata} : 18,6 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 5\text{mL} = 0,093\text{mg}$$

$$\text{Standar} : 50 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 5\text{mL} = 0,25\text{mg}$$

$$\text{Sampel + Standar rata-rata} : 39,4 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 10\text{mL} = 0,394\text{mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[C]f - [C]a}{[C]a^*} \cdot 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(0,394 - 0,093)}{0,25} \cdot 100\% = 120\%$$

4.7.2 Sampel madu merk “Madu Rasa” + larutan standar 50 ppm

$$\begin{aligned}
 1. \quad y &= 0,143 \\
 y &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,143 &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,143 - 0,0465 &= 0,0022x \\
 0,0965 &= 0,0022x \\
 x &= 43,8 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \quad y &= 0,146 \\
 y &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,146 &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,146 - 0,0465 &= 0,0022x \\
 0,0995 &= 0,0022x \\
 x &= 45,2 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \quad y &= 0,141 \\
 y &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,141 &= 0,0022x + 0,0465 \\
 0,141 - 0,0465 &= 0,0022x \\
 0,0945 &= 0,0022x \\
 x &= 42,9 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Konsentrasi sampel madu merk “Madu Rasa” + standar (ppm)	SD
43,8	1,159
45,2	
42,9	

Rata-rata: 43,9

$$\text{Sampel rata-rata : } 43,9 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 5\text{mL} = 0,216\text{mg}$$

$$\text{Standar : } 50 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 5\text{mL} = 0,25\text{mg}$$

$$\text{Sampel + Standar rata-rata : } 43,9 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 10\text{mL} = 0,439\text{mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[C]f - [C]a}{[C]a^*} \cdot 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(0,439 - 0,216)}{0,25} 100\% = 89,2\%$$

4.7.3 Sampel madu murni + larutan standar 50 ppm

1. $y = 0,185$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,185 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,185 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,1385 = 0,0022x$
 $x = 62,9 \text{ ppm}$
2. $y = 0,184$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,184 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,184 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,1375 = 0,0022x$
 $x = 62,5 \text{ ppm}$
3. $y = 0,182$
 $y = 0,0022x + 0,0465$
 $0,182 = 0,0022x + 0,0465$
 $0,182 - 0,0465 = 0,0022x$
 $0,1355 = 0,0022x$
 $x = 61,6 \text{ ppm}$

Konsentrasi sampel madu murni + standar (ppm)	SD
62,9	0,665
62,5	
61,6	
Rata-rata: 62,3	

$$\text{Sampel rata-rata} : 65,6 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 5\text{mL} = 0,328\text{mg}$$

$$\text{Standar} : 50 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 5\text{mL} = 0,25\text{mg}$$

$$\text{Sampel + Standar rata-rata} : 62,3 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times 10\text{mL} = 0,623\text{mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[C]f - [C]a}{[C]a^*} \cdot 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(0,623 - 0,328)}{0,25} 100\% = 118\%$$

	Jenis Madu		
	Madu tanpa merk	Madu merk "Madu Rasa"	Madu murni
Polifenol	120%	89,2%	118%

Lampiran 4. 8 Konversi satuan ppm ke satuan molaritas

Mr Asam Galat ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) = 170,12 gram/mol

a. 1000 ppm

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{1000 \text{ mg}}{170,12 \text{ gram/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 0,0058 \text{ M}$$

b. 10 ppm

$$10 \text{ ppm} = \frac{10 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{10 \text{ mg}}{170,12 \text{ gram/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 0,000058 \text{ M}$$

c. 30 ppm

$$30 \text{ ppm} = \frac{30 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{30 \text{ mg}}{170,12 \text{ gram/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 0,000176 \text{ M}$$

d. 50 ppm

$$50 \text{ ppm} = \frac{50 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{50 \text{ mg}}{170,12 \text{ gram/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 0,000293 \text{ M}$$

e. 70 ppm

$$70 \text{ ppm} = \frac{70 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{70 \text{ mg}}{170,12 \text{ gram/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 0,000411 \text{ M}$$

f. 90 ppm

$$90 \text{ ppm} = \frac{90 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{90 \text{ mg}}{170,12 \text{ gram/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 0,000529 \text{ M}$$