

PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BUNGA PULUTAN (*Urena lobata* L.) DENGAN METODE SPEKTRIFOTOMETRI UV-VIS

DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID CONTENT OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Urena lobata* L. FLOWER USING UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY

Athiah Masykuroh, Ummu Khalifatul Ummah

Prodi DIII Farmasi, Akademi Farmasi YARSI Pontianak
Jl. Panglima A'im No. 2, Pontianak

Corresponding author : athiah.masykuroh@gmail.com

Abstrak

Bunga pulutan (*Urena lobata* L.) memiliki kandungan metabolit sekunder fenol, alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin dan tanin yang efektif sebagai antioksidan sehingga mampu menangkal radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar flavonoid total ekstrak etanol bunga pulutan dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol bunga pulutan dilakukan pada panjang gelombang maksimum 421,5 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga pulutan mengandung senyawa flavonoid dengan kadar flavonoid total ekstrak etanol bunga pulutan yaitu sebesar 20,84%.

Kata kunci : ekstrak etanol, bunga pulutan, flavonoid total, spektrofotometri UV-Vis

Abstract

Urena lobata L. flowers contains secondary metabolites : phenols, alkaloids, flavonoids, terpenoids, saponins and tannins which are effective as antioxidants so have ability to ward off free radicals. The purpose of this study was to determine the total flavonoid content of ethanolic extract of *Urena lobata* L. flowers using the UV-Vis spectrophotometric method. Determination of the total flavonoid content of the ethanolic extract of *Urena lobata* L. flowers was carried out by maximum wavelength of 421.5 nm. The research results showed that the ethanolic extract of *Urena lobata* L. flowers contained flavonoid compounds with total flavonoid content of 20.84%.

Keywords : ethanolic extract, *Urena lobata* L flower, total flavonoids, UV-Vis spectrophotometry

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan alam dengan berbagai jenis tanaman yang dapat berkhasiat sebagai obat tradisional. Obat tradisional semakin banyak diminati oleh masyarakat karena bahan nabatinya mudah didapat dan harganya terjangkau, sehingga bahan yang digunakan harus ditingkatkan mutu dan kualitasnya sesuai dengan kebutuhan masyarakat. Indonesia dengan keanekaragaman hayati terkenal dengan sumber daya alamnya yang melimpah, salah satunya yaitu memiliki aneka ragam tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional. Salah satu tanaman yang sering digunakan oleh masyarakat adalah pulutan. Pulutan adalah tanaman obat yang bernilai ekonomis cukup tinggi sehingga banyak dibudayakan. Daun pulutan berkhasiat sebagai antiwasir, hal ini dikarenakan kandungan kimia daun pulutan terdiri dari sterol, glikosida, karbohidrat, alkaloid, flavonoid, dan tannin (Shealer *et al*, 2017). Akar pulutan berkhasiat sebagai antiinflamasi karena mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin (Mane, 2016), selain itu bagian lainnya yaitu bunga memiliki aktivitas antioksidan kategori sangat kuat dikarenakan kandungan kimia yang sangat kaya seperti fenol, alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin dan tanin (Hidayati dan Masykuroh, 2023)

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Senyawa flavonoid memiliki zat warna merah, ungu, biru, dan zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuhan. Flavonoid terdapat hampir di semua bagian tumbuhan, seperti daun, akar, kulit tepung sari, nektar, bunga, buah dan biji (Worotikan, 2011). Senyawa flavonoid mampu bertindak sebagai antioksidan yang berfungsi untuk menetralkan radikal bebas dan dengan demikian flavonoid merupakan senyawa alam yang berpotensi sebagai anti oksidan yang dapat menangkalkan radikal bebas yang berperan pada timbulnya penyakit degeneratif melalui mekanisme kerusakan sistem imunitas tubuh, oksidasi lipid dan protein (Rais, 2013). Penelitian lanjut terkait bunga pulutan belum pernah dilakukan, oleh karenanya peneliti tertarik untuk mengukur kadar flavonoid total dari bunga pulutan.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Akademi Farmasi Yarsi Pontianak. Waktu penelitian dimulai pada bulan Januari-Mei 2023.

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, neraca analitik Shimadzu AUW220D, spektrofotometri UV-Vis Shimadzu 2600, *rotary vacuum evaporator*, kuvet, tabung reaksi, bejana maserasi, wadah, blender, labu takar 25 ml, gelas piala, kain flanel, *beaker glass*, aluminium foil, pisau *stainless steel*, pipet volume.

Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan antara lain bunga pulutan, etanol 96%, aquades, aluminium klorida ($AlCl_3$), asam sulfat (H_2SO_4) pekat, asam asetat 5% dan 10%, kuersetin.

Prosedur Kerja

Pembuatan Simplisia

Sebanyak 1 kg sampel yang masih segar dicuci lalu ditiriskan kemudian disortasi basah. Dirajang, kemudian dikeringkan menggunakan sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam agar kandungan yang ada didalam bunga tersebut tidak hilang, simplisia yang sudah kering di sortasi kering kembali untuk memisahkan kotoran ataupun partikel yang tercampur pada simplisia pada saat penjemuran, setelah itu simplisia diblender dan ditimbang sebagai berat serbuk simplisia kering. Dimasukkan serbuk simplisia ke dalam kantong plastik atau wadah yang tertutup dan simpan di tempat kering (Depkes RI, 1979)

Pembuatan Ekstrak

Serbuk bunga pulutan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam bejana maserasi. Pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 kemudian ditambahkan sambil diaduk hingga seluruh serbuk kasar terbasahi merata dengan pelarut. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam. Ekstrak di saring hingga memperoleh filtrat. Filtrat yang telah diperoleh dimasukan dalam *rotary vaccum evaporator* pada suhu 50° C, tekanan -200 mbar, dan menggunakan kecepatan 90 rpm sehingga didapat ekstrak kental (Depkes RI,2000)

Uji Kandungan Flavonoid

Uji Kualitatif

Uji H₂SO₄

Dimasukkan larutan uji sebanyak 0,5 gram ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2-4 tetes H₂SO₄. Bila positif senyawa flavonoid ditandai dengan warna merah bata sampai coklat kehitaman, direplikasikan sebanyak 3 kali (Kusnadi dan Devi, 2017).

Uji Kuantitatif

Pembuatan larutan Standar Kuersetin

Ditimbang larutan baku kuersetin sebanyak 25 mg, dilarutkan dalam 25 ml larutan etanol 96% dan didapat 1000 ppm, kemudian diambil 1 ml dengan menggunakan mikropipet yang didapat dari 1000 ppm dan cukupkan sampai 10 ml dengan etanol 96% untuk 100 ppm (Faisal, 2017).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil larutan kuersetin 100 ppm sebanyak 1 ml dan direaksikan dengan 1 mL AlCl₃ 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Lakukan Pembacaan dengan spektrofotometri UV-Visibel pada panjang gelombang 400-800 nm (Sari dan Ayuhecacia, 2017).

Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri kadar dibuat dengan menggunakan kuersetin sebagai baku standar. Dibuat seri kadar sebesar, 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Sebanyak 1 mL larutan seri kadar dari masing-masing konsentrasi direaksikan 0,2 mL AlCl₃10%, 0,2 mL asam asetat 10%, 3 mL etanol 96% dan 5,6 aquadest. Lakukan pembacaan absorbansi seri kadar dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang maksimum (Rivai *et al*, 2011).

Penentuan Kadar Flavanoid Total

Sampel ekstrak etanol 96% bunga pulutan dibuat dengan konsentrasi 100 ppm. Dari konsentrasi 100 ppm kemudian diencerkan menjadi 20 ppm, kemudian diambil

masing-masing sebanyak 2 ml lalu ditambahkan 0,2 mL AlCl₃, 0,2 mL asam asetat 10%, 3 mL etanol 96% dan 5,6 mL aquadest. Lakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum (Rivai *et al*, 2011).

Analisa Data

Analisis data dihitung berdasarkan kurva kalibrasi hasil pembacaan dari alat spektrofotometri UV-Vis dan persamaan regresi linear dengan menggunakan hukum Lambert-Beer seperti berikut (Das *et al.*, 2014).

$$y = bx + a$$

Keterangan: y = absorbansi
 x = konsentrasi (C) mg/L
 b = slope (kemiringan)
 a = intersep

Kemudian dihitung kadar (b/b) flavonoid dengan rumus :

$$\text{kadar } \left(\frac{b}{b}\right) = \frac{C \times v}{F_{ppm}}$$

Keterangan : C = Konsentrasi kuersetin (ppm atau mg/1000 ml)

V = Volume total ekstrak (mL)
 Fp = Faktor pengenceran
 m = Berat sampel (mg)

$$\% \text{ Flavanoid didalam 1 gram bunga pulutan} = \frac{\text{kadar}(b/b)}{1000 \text{ mg}} \times 100 \%$$

Hasil dan Pembahasan

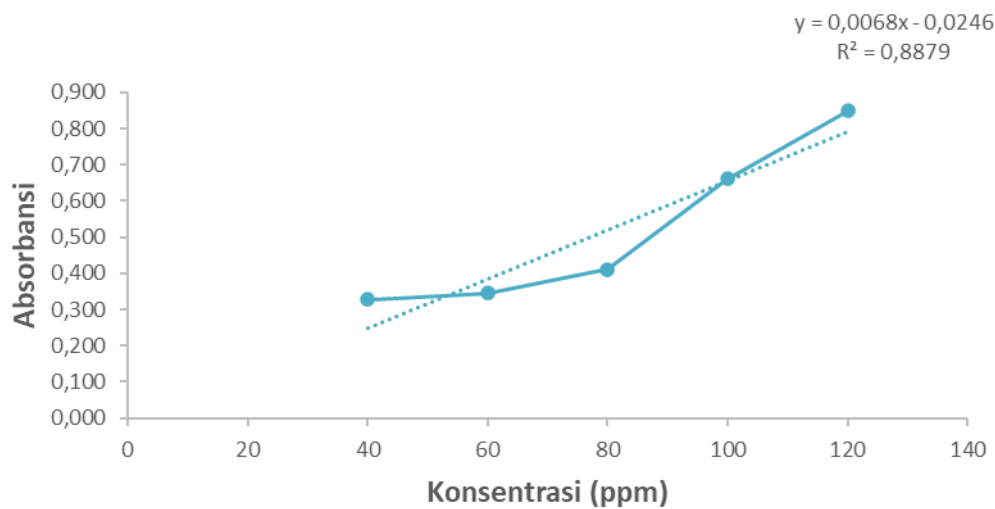
Hasil

Tabel 1. Hasil uji kualitatif kandungan flavonoid menggunakan H₂SO₄

Pereaksi	Secara Teori	Hasil Penelitian	Kesimpulan
H ₂ SO ₄	Coklat	R1	+ senyawa flavonoid
	kehitaman	R2	
		R3	

Tabel 2. Hasil pengukuran absorbansi larutan baku kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
40	0,328
60	0,345
80	0,410
100	0,661
120	0,849



Gambar 1. Kurva baku standar kuersetin

Pembahasan

Pembuatan Simplisia

Bunga Pulutan dikumpulkan seberat 1 kg. Selanjutnya disortasi basah, proses ini dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran pada saat pengumpulan sampel. Setelah dilakukan sortasi basah kemudian dilakukan proses pencucian yang bertujuan untuk membersihkan sisa-sisa kotoran yang masih menempel dan memisahkannya dengan bagian yang tidak diinginkan, pada proses pencucian harus dengan air yang mengalir, karena jika dicuci dengan cara direndam maka kotoran yang sudah lepas akan menempel kembali. Selanjutnya dilakukan proses perajangan yang bertujuan untuk memperkecil permukaan sampel agar mempermudah proses pengeringan. Kemudian dilakukan proses pengeringan, yaitu merupakan kegiatan yang paling penting dalam pengolahan tanaman obat, kualitas produk yang digunakan sangat dipengaruhi oleh proses pengeringan yang dilakukan (Mahapatra *et al*, 2009). Tujuan dari proses pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang kering seberat 100 gram. Proses pengeringan dilakukan dengan cara dikeringkan dibawah sinar matahari dan ditutupi kain hitam yang bertujuan untuk mencegah kerusakan senyawa aktif yang terkandung. Dan tujuan pengeringan ini juga bertujuan agar daya simpannya menjadi lebih lama. Selanjutnya setelah dikeringkan dilakukan sortasi kering tujuannya untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang masih tertinggal dan dihaluskan untuk mempermudah proses ekstraksi dengan metode maserasi.

Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi bunga pulutan dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, sehingga diperoleh ekstrak kental. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia yang paling sederhana, menggunakan pelarut yang cocok dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur kamar (Ditjen POM, 2000). Pemilihan pelarut etanol 96% didasarkan pada kemudahan saat diuapkan serta sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar serta dapat menarik senyawa flavonoid dan fenolik secara optimum (Sulastri *et al.*, 2015).

Setelah sampel direndam dengan etanol selama 24 jam, disaring untuk memisahkan filtrat dari ampas, maserasi dilakukan sebanyak 3 kali menggunakan pelarut yang baru dengan perlakuan maserasi yang pertama menggunakan 1000 ml pelarut etanol 96%. Penggantian pelarut tiap 24 jam dilakukan karena pelarut yang telah jenuh tidak akan menarik komponen fitokimia lagi. Hasil ekstraksi kemudian diuapkan pada suhu 50°C dengan dengan kecepatan 90 rpm dan tekanan -200 mbar untuk menjaga kestabilan senyawa flavonoid. Evaporasi dilakukan pada suhu 50°C bertujuan untuk menghindari kerusakan senyawa metabolit sekunder karena beberapa senyawa metabolit sekunder mudah rusak pada suhu tinggi dilakukan menggunakan *rotary vaccum evaporator*.

Dari hasil ekstraksi sebanyak 100 gram serbuk simplisia bunga pulutan, didapatkan hasil maserasi sebanyak 2.500 ml diperoleh ekstrak kental etanol bunga pulutan sebanyak 9 gram. Dengan rendeman sebesar 9%. Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan perbandingan berat akhir (berat ekstrak yang dihasilkan) dengan berat awal (berat biomassa sel yang digunakan) dikalikan 100% (Sani *et al*, 2014). Budiyanto (2015) menyatakan bahwa semakin tinggi rendemen ekstrak maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik ada pada suatu bahan baku.

Uji Kandungan Flavonoid Uji Kualitatif

Hasil filtrat yang didapat dilakukan uji skrining fitokimia, uji yang dilakukan adalah uji senyawa flavonoid, fenol. Tujuan dilakukan uji fitokimia adalah untuk mengetahui apakah dalam tanaman bunga pulutan tersebut mengandung senyawa flavonoid yang diinginkan, sehingga bisa dilanjutkan penelitian untuk tahap selanjutnya. Hasil uji dapat dilihat pada Tabel. 1.

Pada uji flavonoid H₂SO₄ sampel diteteskan asam sulfat pekat hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna, dari Tabel 1 tersebut dapat dilihat bahwa terjadi perubahan warna menjadi coklat kehitaman. Reaksi ini berlangsung dalam d arah, namun dalam suasana asam kecenderungan untuk membentuk flavon lebih besar, sedangkan kalkon lebih mudah dihasilkan dalam suasana basa. Terbentuknya warna coklat kehitaman karena penambahan H₂SO₄ pekat mengakibatkan terjadinya reaksi substitusi elektrofilik dimana posisi OH pada flavonoid terdistribusi oleh atom H dan H₂SO₄. Sebagaimana lazimnya senyawa aromatic, flavon senantiasa mengalami reaksi substitusi elektrofilik, gugus hidroksi pada flavon mengarahkan reaksinya sebagaimana fenol yang berarti sampel ekstrak bunga pulutan mengandung flavonoid.

Uji Kuantitatif

Larutan standar yang digunakan untuk uji kuantitatif flavonoid yaitu kuersetin. Kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada atom C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Aminah *et al*, 2017). Pengukuran panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan pada panjang gelombang 400-800 nm. Berdasarkan hasil pengukuran panjang gelombang kuersetin diperoleh yaitu 421,50 nm. Pembuatan kurva kalibrasi larutan standar kuerstin diperlukan pengenceran dengan variasi 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum 421,50 nm. Berdasarkan hasil absorbansi larutan standar kuersetin yang didapat, dapat dilihat pada tabel 2. Berdasarkan tabel 2 didapat nilai absorbansi pada masing-masing konsentrasi untuk mengetahui persamaan regresi linear dibuatlah kurva kalibrasi seperti gambar 1.

Kurva kalibrasi merupakan kurva standar dari sampel yang dapat digunakan sebagai acuan untuk sampel tersebut pada percobaan yaitu kuersetin. Pembuatan

kurva kalibrasi bertujuan mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui. Nilai R^2 yang mendekati satu menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang baik antara kadar kuersetin dan absorbansi. Berdasarkan gambar 1 terlihat nilai R^2 dan persamaan garis linear. Nilai R^2 dan Persamaan garis linear menyatakan hubungan antara konsentrasi kuersetin dan nilai absorbansi pada pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Visibel.

Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi setelah dibuat kurva kalibrasi, diperoleh persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0068x - 0,0246$ dengan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0.8879$. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan kurva kalibrasi linier dan terdapat hubungan antara konsentrasi larutan kuersetin dengan nilai serapan (Azizah *et al*, 2014).

Hasil yang diperoleh dari penetapan kadar flavonoid dari ekstrak etanol bunga pulutan yaitu 208,4 mg/g, artinya jika masyarakat mengkonsumsi 1 gram bunga pulutan sebagai lalapan berarti telah mengkonsumsi flavonoid sebanyak 20,84%. Semakin tinggi kadar flavonoid maka semakin tinggi juga manfaat flavonoid sebagai antioksidan karena memiliki kemampuan untuk mencegah radikal bebas. Radikal bebas sangat berbahaya bagi tubuh manusia karena dapat merusak komponen-komponen sel tubuh seperti lipid, protein dan DNA (Dewi *et al*, 2014). Antioksidan berfungsi untuk menetralkan radikal bebas sehingga diharapkan dengan pemberian antioksidan tersebut dapat mencegah terjadinya kerusakan tubuh dan timbulnya penyakit degeneratif.

Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa bunga pulutan (*Urena lobata* L.) positif mengandung flavonoid. Kadar flavonoid total ekstrak etanol bunga pulutan (*Urena lobata* L.) yaitu sebesar 20,84%.

Daftar Pustaka

- Aminah, Tomayahu, N., dan Abidin, Z. 2017. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 4(2) : 226–230.
- Azizah, D.N. dan Faramayuda, F. 2014. Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2).
- Budyanto, A. 2015. Potensi Antioksidan, Inhibitor Tirosinase, dan Nilai Toksisitas dari Beberapa Spesies Tanaman Mangrove di Indonesia.
- Das, N. M. 2014. Antioxidant Activities Of Ethanol Extracts And Fractions Of *Crescentia Cujete* Leaves And Stembark And The Involvement Of Phenolic Compounds. *BMC complementary a*. 14-45.
- Departemen Kesehatan RI. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III*, 378, 535, 612. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Cetakan Pertama, 3-11, 17-19, Dikjen POM, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional.

- Dewi, N.W.O.A.C., Puspawati, N.M., Swantara, I.M.D., Asih, I.A.R.A. dan Rita, W.S.. 2014. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Biji terong Belanda (*Solanum betaceum*) dalam Menghambat Reaksi Peroksidasi Lemak pada Plasma Darah Tikus Wistar. *Cakra Kimia Indonesia E-Journal of Applied Chemistry*. 2(1) : 7-16.
- Faisal, I. 2017. Penetapan Kadar Flavonoid Pada Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia Swingle*) Dengan Metode Spektrofotometri Visible. Karya Tulis Ilmiah. Akademi Farmasi Isfi Banjarmasin. Banjarmasin.
- Hidayati, S. Dan Masykuroh, A. 2023. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Pulutan (*Urena lobata L.*) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional*. 3(1) : 494-508
- Kusnadi dan Devi, E.T . 2017. Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) dengan metode refluks. *Pancasakti Science Education Journal*. 2(1) : 56-67.
- Mahapatra, A.K. and C.N. Nguyen. 2009. Dying Of Medical Plant. *ISHS Acta Horticulturae 756: Internasional Symposium on Medical and Neutraceutical Plants*
- Mane, S. 2016. Exploring The Pharmacognostic Characteristics And Antimicrobial Potential. 7(11) : 31– 37. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0711124>.
- POM, D. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Rais, F. 2013. "Beef Marketing Efficiency In Gorontalo City". *Jurnal Fakultas Ilmu-Ilmu Pertanian*. 1(1) : 1-10.
- Rivai, H., Nurdin, H., Suyani, H. dan Bakhtiar, A. 2011. ,Pengaruh Cara Pengeringan Terhadap Mutu Herba Meniran (*Phyllantus Niruri L.*). *Majalah Farmasi Indonesia*. 22(1) : 73-76.
- Sani, R.N., Fithri C.N., Ria D.A., dan Jaya M.M. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(2) :121-126.
- Sari, A.K. dan Ayuhecara, N. 2017. Penetapan Kadar Fenolik Total dan fFavonoid Total Ekstrak Beras Hitam (*Oryza sativa L*) dari Kalimantan Selatan. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2(2): 327-335. Shealer, P. A., Gharge, V. G., & Yadav, A. V. (2017). Pharmacognostic Evaluation, Phytochemical Screening and Antimicrobial Study of Leaves Extracts of *Urena lobata* Linn *Current. Research in Pharmaceutical Sciences*, 07(02) : 40-49.
- Sulastri, E. O. 2015. Formulasi Mikroemulsi Ekstrak Bawang Hutan dan Uji Aktivitas Antioksidan, *Jurnal Pharmascience*, 2(2) : 1-14.

Worotikan. 2011. Efek Buah Lemon Cui (*Citrus microcarpa*) Terhadap Kerusakan Lipida Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) dan Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*) Mentah. Skripsi. FMIPA UNSRAT. Manado.