

**VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRI UV-
VIS DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID EKSTRAK
ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)**

SKRIPSI



**Oleh:
Jefrica Maulidah Pratiwisari S P
NIM. 18040048**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2022**

**VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRI UV-
VIS DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID EKSTRAK
ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh:
Jefrica Maulidah Pratiwisari S P
NIM. 18040048

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2022**

LEMBAR PERSETUJUAN

Hasil penelitian ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti seminar hasil pada Program Studi Sarjana Farmasi Universitas
dr. Soebandi

Jember, 21 Juli 2022

Pembimbing Utama,



Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm
NIDN 0001028102

Pembimbing Anggota,



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN 0703068903

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul *Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Dan Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao (Theobroma cacao L.)* telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Hari : Kamis

Tanggal : 04 Agustus 2022

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji
Ketua Penguji,

Susilawati, M.Kes
NIDN. 4003127401

Penguji II,

Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm
NIDN 0001028102

Penguji III,

apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN 0703068903

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr. Soebandi

Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kep
NIDN. 0706109104

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Jefrica Maulidah Pratiwisari S P

NIM : 18040048

Program Studi : Sarjana Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau hasil tulisan orang lain

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain atau ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jember, 21 Juli 2022

Menyatakan,

Jefrica Maulidah Pratiwisari S P

SKRIPSI

VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

Oleh :

Jefrica Maulidah Pratiwisari S P

NIM. 18040048

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm

Dosen Pembimbing Anggota : apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dengan sepenuh hati saya persembahkan kepada :

1. Allah swt yang telah memberikan tuntunan, petunjuk, hidayah, dan limpah kasih sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi dengan baik
2. Alm. kakek saya yang membuat saya tetap bertahan sampai detik ini dan menyelesaikan jenjang perkuliahan dengan baik
3. Mama saya tercinta yang selalu mendukung dan mendoakan saya sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan baik
4. Keluarga besar yang selalu memberi dukungan dan doa
5. Ibu Susilawati selaku dosen penguji yang memberikan kemudahan pada saat ujian berlangsung
6. Ibu Ayik selaku dosen pembimbing yang selalu memberi motivasi sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan mudah
7. Ibu Linda selaku dosen pembimbing akademik dan dosen pembimbing skripsi yang selalu memberi motivasi dan mendukung untuk segera menyelesaikan skripsi dengan mudah
8. Ibu Dhina selaku wali kelas 18A yang selalu memberi semangat untuk menyelesaikan skripsi
9. Ibu Aliyah selaku komisi skripsi yang selalu mengingatkan batas seminar hasil sehingga memotivasi untuk menyelesaikan dengan cepat
10. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang telah memberikan kesempatan untuk menggunakan biji kopi sebagai bahan penelitian

11. Tim laboran yang selalu mendukung dan memberi motivasi dalam penelitian
12. Teman-teman kelas 18A Farmasi yang saling memberi semangat untuk segera menyelesaikan skripsi dan lulus bersama
13. Dewan Perwakilan Mahasiswa yang selalu mengingatkan untuk segera lulus
14. Mileni Krisdiantita yang selalu mendengar keluhan menyusun skripsi dan selalu memberi semangat untuk menjalaninya
15. Teman-teman cluster tidar x-10 yang selalu mendukung dan memberi semangat dalam penyusunan skripsi dan penelitian
16. Teman-teman Semeru *Café & Resto* yang selalu memberi motivasi dan menghibur disaat mulai lelah dengan skripsi dan membuat saya bangkit kembali
17. *Last but not least, I wanna thank me. I wanna thank me for believing in me. I wanna thank me for doing all this hard work. I wanna thank me for having no days off. I wanna thank me for never giving up.*

MOTTO

“Life is C between B and D”

Jean-Paul Sartre

ABSTRAK

Maulidah Pratiwisari S P, Jefrica*. Rosita Puspaningtyas, Ayik**. Setyaningrum, Lindawati***. **Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis dan Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)**. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang : Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder salah satunya yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang banyak terkandung di dalam biji kakao yang berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk memvalidasi metode analisis untuk penetapan kadar flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

Metode : Design penelitian ini yaitu penelitian kuantitatif dengan metode studi eksperimental. Ekstrak etanol biji kakao dilakukan identifikasi senyawa flavonoid, pengukuran panjang gelombang, *operating time*, dan konsentrasi optimum, uji validasi metode analisis dengan lima parameter meliputi spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantitation* (LOQ), dan uji penetapan kadar flavonoid

Hasil penelitian : Ekstrak etanol biji kakao pada penelitian ini mengandung senyawa flavonoid, panjang gelombang yang diperoleh yaitu 443 nm, serapan stabil pada menit ke-15 dan ke-20 dengan absorbansi 0,607 dan 0,608, dan konsentrasi optimum standar 40 ppm dan sampel 1800 ppm. Penelitian ini menghasilkan uji spesifisitas yang baik dimana uji linieritas dengan nilai korelasi $r = 0,988$ dan $V_{xo} = 1,28$, uji akurasi memenuhi rentang 90%-107%, uji presisi $RSD \leq 5\%$, uji *limit of detection* (LOD) = 8,66 ppm dan *limit of quantitation* (LOQ) = 28,867 ppm. Penetapan kadar flavonoid total didapatkan $21,667 \pm 0,482$ mg/QE/g.

Kesimpulan : Validasi metode analisis telah memenuhi syarat validasi meliputi spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, dan *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantitation* (LOQ). Validasi metode dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar flavonoid dan didapatkan $21,667 \pm 0,482$ mg/QE/g.

Kata Kunci : Kakao, flavonoid, validasi metode, spektrofotometri UV-Vis

*Peneliti

**Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Maulidah Pratiwisari S P, Jefrica*. Rosita Puspaningtyas, Ayik**. Setyaningrum, Lindawati***. **Validation of Method by Spectrofotometric UV-Vis and Determination of Flavonoids Content of the Ethanolic Extract of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L).** Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program. University of dr. Soebandi.

Introduction : Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a plant which contains secondary metabolites, one of which is flavonoids. Flavonoids are one of the many compounds contained in cocoa beans that have the potential as antioxidants. The purpose of this research is to validate the analysis method for the determination of flavonoid total content in ethanol extract of cocoa beans by UV-Vis spectrophotometric.

Method : The design of this research is quantitative research with experimental study methods. The process of this research towards cocoa beans extract such as flavonoid compounds identification, wavelength measurement, operating time and optimum concentration, five parameters of validation test such as linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and flavonoid content determination. Next, we analyzed flavonoid total test, too.

Research result : In this study, the ethanol extract of cocoa beans contained flavonoid compounds, the wavelength obtained was 443 nm, the absorption was stable at the 15th and 20th minutes with absorbances of 0.607 and 0.608, and the optimum concentration standard was 40 ppm and the sample was 1800 ppm. This results showed good specificity test where linearity test obtained correlation value $r = 0.988$ and $V_{xo} = 1.28$, accuracy test gave value in the range 90%-107%, precision test was $RSD \leq 5\%$, limit of detection test (LOD) = 8,66 ppm and limit of quantitation (LOQ) = 28.867 ppm. Determination of total flavonoid content of Cocoa beans was obtained 21.667 ± 0.482 mg/QE/g.

Conclusion : The validation methods has qualified of its validation includes specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). This validation methods was applied for determination of flavonoid and obtained 21.667 ± 0.482 mg/QE/g.

Keywords : Cocoa, flavonoids, method validation, spectrophotometric UV-Vis

*Researcher

**Advisor 1

***Advisor 2

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas segala limpahan rahmat, taufik, dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi untuk memehuni persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi yang berjudul “Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Dan Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)” dengan tepat waktu.

Penyusunan skripsi ini dapat terlaksana dengan baik berkat bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Drs. Said Mardijanto, S.Kep., Ns., M.M selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
2. Ibu Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kes selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3. Ibu apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
4. Ibu Susilawati, M.Kes selaku Ketua Penguji
5. Ibu Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama
6. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku Dosen Pembimbing Anggota

Penyusunan skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan dan penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih.

Jember, 21 Juli 2022

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	v
HALAMAN PEMBIMBING SKRIPSI	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
MOTTO	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat	6
1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti.....	6
1.4.2 Manfaat Bagi Mahasiswa.....	6
1.4.3 Manfaat Bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao	6
1.4.4 Manfaat Bagi Institusi	6
1.5 Keaslian Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	9

2.1.1 Klasifikasi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	9
2.1.2 Morfologi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	10
2.1.3 Kandungan Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	15
2.1.4 Manfaat Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	16
2.2 Ekstraksi.....	18
2.3 Senyawa Flavonoid	24
2.3.1 Deskripsi Senyawa Flavonoid.....	24
2.3.2 Sifat Fisika dan Kimia Flavonoid	25
2.4 Validasi Metode Analisis	26
2.5 Spektrofotometri UV-Vis.....	35
2.5.1 Tipe Spektrofotometri UV-Vis	37
2.5.2 Syarat Pengukuran	38
2.5.3 Interaksi Sinar UV-Vis Dengan Senyawa.....	39
2.5.4 Spektrum UV-Vis	41
BAB III. KERANGKA KONSEP.....	43
3.1 Kerangka Konsep.....	43
3.1 Hipotesis.....	44
BAB IV. METODE PENELITIAN	45
4.1 Desain Penelitian.....	45
4.2 Populasi dan Sampel	45
4.2.1 Populasi.....	45
4.2.2 Sampel.....	46
4.3 Variabel Penelitian.....	46
4.3.1 Variabel <i>Dependent</i> (terikat).....	46
4.3.2 Variabel <i>Independent</i> (bebas)	46
4.4 Tempat Penelitian.....	46
4.5 Waktu Penelitian	46
4.6 Definisi Operasional.....	47
4.7 Teknik Pengumpulan Data.....	49
4.7.1 Determinasi Tanaman	49
4.7.2 Pengambilan Sampel.....	49

4.7.3 Ekstraksi Sampel.....	49
4.7.4 Identifikasi Senyawa Flavonoid.....	50
4.7.5 Preparasi Larutan	50
4.7.6 Validasi Metode Analisis	52
4.7.7 Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao	54
BAB V. HASIL PENELITIAN	55
5.1 Data Umum Penelitian	55
5.1.1 Determinasi Tanaman	55
5.1.2 Ekstraksi Sampel.....	55
5.1.3 Identifikasi Senyawa Flavonoid.....	55
5.1.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	55
5.1.5 Penentuan <i>Operating Time</i>	56
5.1.6 Penentuan Konsentrasi Optimum.....	57
5.2 Data Khusus Penelitian	57
5.2.1 Spesifisitas	57
5.2.2 Linieritas	59
5.2.3 Akurasi	59
5.2.4 Presisi	60
5.2.5 <i>Limit of Detection</i> dan <i>Limit of Quantitation</i>	60
5.2.6 Penetapan Kadar.....	61
BAB VI. PEMBAHASAN.....	62
6.1 Identifikasi Senyawa Flavonoid.....	62
6.1.1 Uji Shinoda	62
6.1.2 Uji H ₂ SO ₄	62
6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	63
6.3 Penentuan <i>Operating Time</i>	64
6.4 Penentuan Konsentrasi Optimum.....	64
6.5 Validasi Metode Analisis Secara Spektrofotometri UV-Vis	65
6.5.1 Spesifisitas	66
6.5.2 Linieritas	68
6.5.3 Akurasi	69

6.5.4 Presisi	70
6.5.5 <i>Limit of Detection</i> dan <i>Limit of Quantitation</i>	72
6.6 Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Biji Kakao.....	73
BAB VII. PENUTUP.....	75
7.1 Kesimpulan	75
7.2 Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA.....	76
LAMPIRAN.....	85

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	7
Tabel 2.1 Komposisi Kimia Keping Biji dan Kulit Biji Kakao	15
Tabel 2.2 Perbandingan Konsentrasi Analit Dengan Akurasi	28
Tabel 2.3 Perbandingan Konsentrasi Analit Dengan Presisi	30
Tabel 2.4 Serapan Sinar UV Pada $\lambda_{\max}$	39
Tabel 4.1 Definisi Operasional	47
Tabel 5.1 Penentuan <i>Operating Time</i>	56
Tabel 5.2 Penentuan Konsentrasi Optimum.....	57
Tabel 5.3 Akurasi	59
Tabel 5.4 Presisi	60
Tabel 5.5 Penetapan Kadar	61

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pohon Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	9
Gambar 2.2 Batang dan Cabang Kakao	10
Gambar 2.3 Daun Kakao.....	11
Gambar 2.4 Akar Kakao	12
Gambar 2.5 Bunga Kakao	13
Gambar 2.6 Buah Kakao	13
Gambar 2.7 Biji Kakao	14
Gambar 2.8 Ekstraksi Maserasi.....	19
Gambar 2.9 Ekstraksi Perkolasi	20
Gambar 2.10 Panci Infus dan Penangas	21
Gambar 2.11 Alat Ekstraksi Sokletasi	22
Gambar 2.12 Alat Ekstraksi Refluks.....	23
Gambar 2.13 Stuktur Flavonoid	24
Gambar 2.14 Contoh Sepktrum Spesifisitas	32
Gambar 2.15 Alat Spektrofotometri UV-Vis (<i>single beam</i>)	37
Gambar 2.16 Alat Spektrofotometri UV-Vis (<i>double beam</i>).....	38
Gambar 2.17 Tipe Transisi Elektron Dalam Molekul Organik	40
Gambar 2.18 Gambaran Spektrum UV-Vis	41
Gambar 2.19 Absorbansi Sinar UV-Vis	42
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	43
Gambar 5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	56
Gambar 5.2 Spektra Standar	58
Gambar 5.3 Spektra Sampel.....	58
Gambar 5.4 Spektra Sampel dan Analit Lain.....	58
Gambar 5.5 Linieritas.....	59
Gambar 6.1 Reaksi Flavonoid Dengan Magnesium	62
Gambar 6.2 Reaksi Flavonoid Dengan H ₂ SO ₄	63
Gambar 6.3 Reaksi pembentukan kompleks antara flavonoid dan AlCl ₃	67

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Hasil Determinasi Tanaman	85
Lampiran 2. Certificate of Analysis Quercetin	86
Lampiran 3. Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kakao	87
Lampiran 4. Identifikasi Senyawa Flavonoid	88
Lampiran 5. Pembuatan Pereaksi AlCl_3 Dan CH_3COONa	89
Lampiran 6. Perhitungan Pembuatan Larutan Baku Kuersetin.....	90
Lampiran 7. Perhitungan Penentuan Konsentrasi Optimum.....	91
Lampiran 8. Perhitungan Validasi Metode Analisis	94
Lampiran 9. Perhitungan Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao	104

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu tanaman dari jutaan jenis flora yang dilestarikan untuk dijadikan komoditas yang berperan penting dalam perekonomian Indonesia. Jember adalah salah satu kota di bagian Jawa Timur yang memproduksi sekitar ± 2.000 ton kakao. Di Kabuptaen Jember tepatnya di Kecamatan Jenggawah memiliki Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia atau disebut PUSLITKOKA yang berdiri sejak 1911 (Felicia *et al.*, 2016). Pada Puslitkoka ini dari hasil perkebunannya dapat diolah menjadi produk makanan, minuman, permen atau sabun yang dikeluarkan dengan nama Vicco (berbahan dasar coklat). Produk – produk Vicco ini diambil dari biji kakao yang telah melewati panjang dimulai pada proses penanaman biji kakao sendiri, perawatan pohon, panen biji kakao hingga proses fermentasi (Felicia *et al.*, 2016). Asal usul nama brand Vicco mengandung sebuah arti perusahaan coklat rakyat atau *Village Chocolate Company* dan makna lainnya dari nama brand tersebut untuk membantu peningkatan kesejahteraan petani kakao dan pekerja koperasi yang ada di Kecamatan Jenggawah tersebut (Felicia *et al.*, 2016).

Selain untuk membantu mengangkat ekonomi warga Jember, produk Coklat Vicco sendiri memiliki manfaat dan kandungan gizi untuk tubuh manusia. Pada umumnya biji kakao sendiri memiliki nutrisi berupa lemak, karbohidrat, protein. Kandungan lain seperti kafein dan tiobromin membuktikan dapat meredakan mood serta kelelahan sehingga dapat digunakan sebagai antidepresan (Husna *et al.*, 2017).

Di dalam biji kakao tersebut juga mengandung kandungan senyawa metabolit lain seperti polifenol, flavonoid dan tanin (Hafidhah *et al.*, 2017). Senyawa – senyawa tersebut dapat dikelompokkan menjadi senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder merupakan suatu biomolekul yang digunakan sebagai bahan penemuan baru dalam pengembangan obat – obatan (Ergina *et al.*, 2014). Salah satu kandungan senyawa metabolit sekunder dari Kakao (*Theobroma cacao* L.) adalah flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang banyak terkandung di dalam biji kakao maka sebab itu penetapan kadar ini memilih flavonoid untuk memfokuskan sebagai senyawa yang akan diteliti dan flavonoid di dalam biji kakao sendiri berpotensi sebagai antioksidan dengan menangkal radikal bebas (Erwiyani *et al.*, 2021).

Menurut Rahayu *et al* (2009) penetapan kadar dapat dilaksanakan dengan menggunakan instrumental Spektrofotometri UV-Vis. Spektrofotometri UV-Vis merupakan suatu instrument analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik sinar UV (ultraviolet) dan sinar tampak (Visible) dengan menggunakan instrument spektrofotometer. Di dalam sebuah penetapan kadar khususnya flavonoid, kuersetin sebagai standar pembanding karena kuersetin merupakan golongan senyawa flavonoid (flavonol) yang memiliki gugus keto pada C₄ dan gugus hidroksi pada C₃ atau C₅ sehingga hal tersebut dapat membantu pembentukan kompleks sebuah warna dengan AlCl₃ (Ipandi *et al.*, 2016).

Kelebihan penggunaan Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk menganalisis zat – zat organik atau anorganik, utamanya metode spektrofotometri ini memberikan langkah sederhana untuk menetapkan kuantitasi suatu zat yang

sangat kecil, keakuratan instrument akan dibaca cepat oleh detektor dan akan tercetak dalam bentuk angka digital atau grafik yang telah diregresi (Wardani, 2021). Ketelitiannya yang tinggi dengan kesalahan sebesar 1 – 3%, mudah mendapatkan hasil yang cukup akurat dan instrumen ini dapat digunakan sebagai penetapan kuantitas zat yang sangat kecil (Rohmah *et al.*, 2021). Namun dari kelebihan tersebut, Spektrofotometri UV-Vis memiliki kekurangan yaitu senyawa yang dianalisis harus memiliki gugus kromofor dengan ikatan rangkap terkonjugasi, memiliki panjang gelombang yang tersampaikan pada daerah ultraviolet atau daerah visible, pH larutan, suhu dan zat pengotor dapat mempengaruhi hasil dari absorbansi yang terukur (Tetha & Sugiarso, 2016).

Spektrofotometri UV-Vis jika dibandingkan dengan instrument lain seperti kromatografi lapis tipis, spektrofotometri UV-Vis lebih akurat sebab resolusi KLT pada pemisahan senyawanya lebih rendah sehingga tidak banyak senyawa metabolit yang terdeteksi dan penggunaan metode KLT juga membutuhkan ketekunan yang tinggi serta sistem *trial and error* untuk menentukan kecocokan pada eluen (Anwar *et al.*, 2017). Dibanding dengan spektrofotometri UV-Vis dan KLT, ada pula instrumen lain seperti Spektrofotometri Serapan Atom (AAS) namun instrumen tersebut hanya digunakan untuk menghitung kuantitas dari unsur logam dan metaloid berdasar penyerapan absorbansi radiasi oleh atom bebas pada fase gas (Kusuma *et al.*, 2019).

Validasi metode analisis merupakan satu tindakan penilaian terhadap parameter yang melalui percobaan di laboratorium untuk pembuktian bahwa suatu parameter tersebut memenuhi syarat penggunaannya (Harmono, 2020). Tujuan

dilakukannya validasi metode analisis ini adalah untuk membuktikan pada penelitian bahwa semua langkah atau prosedur pengujian yang digunakan dapat mencapai hasil yang diinginkan secara konsisten (Wisudyaningsih, 2015).

Pada penelitian sebelumnya Azizah *et al.* (2014) melakukan sebuah penelitian penetapan kadar flavonoid namun menggunakan sampel dari kulit buah kakao menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Penelitian lain dari Kayaputri *et al.* (2012) yang dilakukan pada biji kakao hanya sebatas kajian fitokimia yang menganalisis menggunakan GC-MS. Sehingga sejauh ini, penelitian ini penting untuk dilakukan sebab belum ada spesifik penelitian yang dilaksanakan untuk validasi metode dan penetapan kadar flavonoid pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara spektrofotometri UV-Vis. Instrumen spektrofotometri UV-Vis pun digunakan agar senyawa dapat dianalisis karena salah satu syarat dari pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis yaitu memiliki gugus kromofor pada strukturnya (Dewi *et al.*, 2017).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan validasi metode analisis untuk penetapan kadar flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara spektrofotometri UV-Vis agar supaya diperoleh metode analisis yang valid, akurat dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana identifikasi kandungan senyawa kimia flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.)?

2. Bagaimana optimasi dan validasi metode analisis flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang menggunakan pembanding kuersetin secara spektrofotometri UV-Vis?
3. Berapa kadar senyawa flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang menggunakan pembanding kuersetin secara spektrofotometri UV-Vis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui validasi metode analisis untuk penetapan kadar flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara spektrofotometri UV-Vis.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kimia flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.)
2. Untuk menentukan optimasi dan validasi metode analisis flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang menggunakan pembanding kuersetin secara spektrofotometri UV-Vis.
3. Untuk menentukan kadar senyawa flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang menggunakan pembanding kuersetin secara spektrofotometri UV-Vis.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat bagi Peneliti

1. Dapat digunakan sebagai sumber informasi kepada peneliti tentang validasi metode dan penentuan kadar dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara Spektrofotometri UV-Vis.
2. Dapat digunakan sebagai sumber data ilmiah atau rujukan bagi peneliti yang akan melanjutkan tentang validasi metode dan penentuan kadar flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara Spektrofotometri UV-Vis.

1.4.2 Manfaat bagi Mahasiswa

1. Dapat digunakan sebagai referensi mahasiswa untuk proposal penelitian.
2. Dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut tentang validasi metode dan penentuan kadar dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara Spektrofotometri UV-Vis.

1.4.3 Manfaat bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao

1. Dapat menambah referensi penelitian untuk Pusat Penelitian Kopi dan Kakao
2. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dapat mengembangkan penelitian atau meneliti lebih lanjut dari validasi metode dan penentuan kadar dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara Spektrofotometri UV-Vis

1.4.4 Manfaat bagi Institusi

1. Dapat digunakan sebagai bahan contoh dalam praktek perkuliahan.

2. Dapat digunakan untuk melanjutkan penelitian tentang validasi metode dan penentuan kadar dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara Spektrofotometri UV-Vis.
3. Dapat digunakan sebagai tolok ukur dalam penelitian yang serupa yang dilaksanakan oleh institusi.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Peneliti	Judul	Perbedaan	Persamaan
Alwi, 2017	Validasi Metode Analisis Flavonoid Dari Ekstrak Etanol Kasumba Turate (<i>Carthamus Tinctorius</i> L.) Secara Spektrofotometri Uv-Vis.	1. Simplisia menggunakan Kasumba Turate (<i>Carthamus Tinctorius</i> L.) 2. Pelarut yang digunakan etanol 70%	1. Analisis senyawa metabolit flavonoid 2. Intrumen menggunakan spektrofotometri UV-Vis 3. Menggunakan standar kuersetin
Azizah et al., 2014	Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl ₃ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	1. Simplisia menggunakan kulit buah kakao 2. Pelarut yang digunakan Metanol	1. Penentuan kadar flavonoid 2. Intrumen menggunakan spektrofotometri UV-Vis 3. Menggunakan metode AlCl ₃
Pappa et al., 2019	Kadar Tanin Pada Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Kabupaten	1. Mencari kadar tanin 2. Menggunakan kulit buah	Intrumen menggunakan spektrofotometri UV-Vis

	Poliwalimandar dan Toraja Utara	kakao 3. Menggunakan pelarut metanol 96%	
Yeti & Yuniarti, 2021	Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Herba Rumput Bambu (<i>Lopatherum gracile Brongn.</i>) Dengan Metode Spektrofotometri Visible	Simplisia menggunakan Herba Rumput Bambu	1. Instrumen menggunakan Spektrofotometri UV-Vis 2. Pelarut menggunakan etanol 96% 3. Analisis senyawa Flavonoid

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan satu dari beberapa jenis tanaman budidaya yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Indonesia menjadi urutan nomer 3 dengan penghasil kakao terbanyak yaitu sebesar 17,0% setelah Pantai Gading (31,6%) dan Ghana (18,2%). Terdapat 22 jenis genus *Theobroma*, family *Sterculiaceae*, hanya *Theobroma cacao* L. dan *Theobroma grandiflorum* yang dibudidayakan secara komersil (Martono, 2014).

2.1.1 Klasifikasi Kakao (*Theobroma cacao* L.)



Gambar 2.1 Pohon Kakao (*Theobroma cacao* L.)
(Jefrica, 2022)

Menurut Jefrica (2022), tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Subkelas	: <i>Dialypetalae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>

Spesies : *Theobroma cacao* L.

2.1.2 Morfologi Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Tanaman kakao tergolong sebagai tanaman tahunan dan termasuk tanaman dikotil (biji berkeping dua) dengan 10 pasang kromosom. *Theobroma cacao* L. terbagi menjadi 2 subjenis yaitu *Theobroma cacao* L. dan *Theobroma sphaerocarpum*. Pertumbuhan *Theobroma sphaerocarpum* lebih kuat dan produktivitasnya lebih tinggi dibanding dengan *Theobroma cacao*. Kakao subjenis *T. sphaerocarpum* memiliki ciri buah halus, kulit buah relative lebih tipis namun keras, bentuk biji oval, pipih dan kecil.

a. Batang (*caulis*)



Gambar 2.2 Batang dan Cabang Kakao
(Suyono & Carnovia, 2018)

Batang dari tanaman kakao tumbuh dengan tinggi sekitar 1,8 – 3 meter saat umur 3 tahun dan 4,5 – 7 meter saat tanaman kakao berumur 12 tahun sedangkan kakao yang tumbuh liar dapat mencapai setinggi 20 meter (Martono, 2014). Pada batang kakao memiliki cabang primer dengan ketinggian 1,2 – 1,5 meter dari permukaan tanah dengan arah sudut pertumbuhan berkisar 45° dengan warna coklat muda sampai tua. Cabang kakao ini memiliki 2 jenis yaitu cabang orthotrop

(tumbuh ke atas) dan cabang plagiotrop (tumbuh ke samping). Adapun cabang sekunder yang memiliki sudut pertumbuhan 60° berwarna coklat muda sampai tua dengan jarak antara ketiak daun berkisar 2 – 5 meter (Martono, 2014).

b. Daun (*folium*)



Gambar 2.3 Daun Kakao
(Suyono & Carnovia, 2018)

Daun dari kakao memiliki panjang sekitar 10 sampai 48 cm, lebar 4 sampai 20 cm dengan permukaan bagian atas daun berwarna hijau tua, bergelombang, permukaan bagian bawah daun berwarna hijau muda, kasar dan bergelombang, tepi daun memiliki visual rata sampai agak bergelombang. Susunan tulang daun ayng dimiliki daun kakao ini berbentuk menyirip dengan hanya memiliki satu ibu tulang daun dari pangkal hingga ke ujung daun dean alur dari tulang daun ini tampak jelas (Martono, 2014).

Jenis daun kakao ini adalah daun tunggal (*simplex*) dimana pada sebuah tangkainya hanya terdapat satu helai daun saja. Daun kakao memiliki helai daun yang bulat memanjang, ujung dan pangkal daun meruncing. Sifat tangkai daun kakao ini berbentuk silinder, bersisik halus, pangkalnya membulat dan ujung meruncing dengan panjang mencapai $\pm 25 - 28$ mm dan diaemeter 3 – 7,4 mm (Suyono & Carnovia, 2018).

c. Akar (*radix*)



Gambar 2.4 Akar Kakao
(Suyono & Carnovia, 2018)

Dalam sebuah tanaman yang membuat tanaman tersebut berdiri dengan kokoh adalah sebuah akar yang tumbuh ke bawah tanah dengan fungsi lain yaitu untuk menyerap air, menyerap zat –zat makanan dan membawanya ke tempat yang memerlukan. Jenis akar yang dimiliki oleh kakao ini adalah akar tunggang yang disertai dengan akar serabut dan berkembang ke permukaan tanah ± 30 cm. Pertumbuhan dari akar kakao ini dapat mencapai 8 meter ke arah samping dan 15 cm ke arah bawah tanah, akar pohon kakao memiliki tebal sekitar 30 – 50 cm (Martono, 2014).

Pada perkembangan akar pohon kakao berbeda tergantung dengan keadaan tanah yang ditumbuhinya. Pada tanah dengan konsentrasi air yang tinggi seperti pada lereng gunung, akar tersebut akan tumbuh panjang dan menembus sangat dalam ke tanah. Sedangkan pada tanah liat dengan konsentrasi air yang tinggi untuk waktu yang lama pada tiap tahunnya, akar tunggang pada kakao tidak begitu dalam masuk ke dalam tanah (Suyono & Carnovia, 2018).

d. Bunga (*flos*)



Gambar 2.5 Bunga Kakao
(Suyono & Carnovia, 2018)

Sebaran bunga kakao ini terletak di batang dan cabang saja atau disebut cauliflora (pertumbuhan bunga atau buah yang tidak pada pucuknya batangnya). Ciri bung kakao ini ukurannya yang kecil, berwarna putih agak ungu kemerahan dan tidak berbau, diameter bunga kakao 1 – 2 cm. Bunga kakao tergolong sebagai bunga sempurna karena memiliki alat kelamin putik dan benang sari berjumlah 10 helai, bunga kakao memiliki 5 helai kelopak bunga. Panjang tangkai dari bunga sekitar 2 – 4 cm dengan warnanya bisa hijau muda, hijau atau kemerahan. Dalam hal yang normal, tanaman kaako ini dapat menghasilkan bunga sekitar 6000 – 10.000 per tahunnya dan sekitar 5% saja yang dapat berbuah (Martono, 2014).

e. Buah (*fructus*)



Gambar 2.6 Buah Kakao
(Suyono & Carnovia, 2018)

Buah kakao terbagi menjadi 4 macam berdasarkan bentuknya yaitu Angoleta (buah berbentuk oblong), Cundeamor (buah ellips), Amelonada dan

Calabicol (berbentuk bulat). Permukaan dari buah ini bisa halus, agak halus, agak kasar amupun kasar dengan alur yang pendek, sedang dan dalam. Panjang buah bisa mencapai 16,2 – 20,50 cm dengan diameter 8 – 10,07 cm. Buah kakao muda memiliki variasi warna seperti merah muda keputihan, merah muda kecoklatan, merah hijau, merah tua, hijau muda, hijau kecoklatan atau merah kehijauan. Sedangkan buah kakao yang matang dapat berwarna merah kekuningan, kuning cerah, kuning kehijauan dan orange (Martono, 2014).

Buah kakao terbentuk setelah 14 hari adanya penyerbukan bunga. Buah akan berkembang sampai waktunya panen sekitar 143 hari dengan mencapai perkembangan fisik yang maksimal. Setelah itu, buah tidak lagi bertambah besar ataupun panjang. Buah mengalami masak yang optimal setelah 170 hari yang ditandai pada perubahan warna kulit buah sesuai dengan varietasnya. Menurut Sunanto (1992) dalam Martono (2014) butuh waktu sekitar 5,5 bulan untuk pertumbuhan buah kakao jika pohon terdapat di daerah dataran rendah dan 6 bulan jika di dataran tinggi.

f. Biji (*semen*)



Gambar 2.7 Biji Kakao
(Suyono & Carnovia, 2018)

Biji (*semen*) kakao terbagi menjadi tiga bagian yaitu kotiledon (87,10%), kulit biji (12%) dan lembaga (0,9%). Biji kakao berbentuk bulat oval agak pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 cm, biji kakao juga diselimuti lendir berwarna putih. Biji

kakao tidak memiliki masa dormansi sehingga benih tidak mungkin untuk disimpan dalam waktu yang agak lama. Saat penyimpanan benih, membutuhkan temperature antara 4 - 15°C dapat merusak benih dan kecambah (Martono, 2014).

Biji kakao ini termasuk tanaman *calflori* yaitu dimana buah dan bunga tumbuh hanya pada batang dan cabang tanaman saja. Pada tiap batang pohon terdapat 20 – 50 butir biji yang tersusun dalam 5 baris dan menyatu dengan bagian buah (Suyono & Carnovia, 2018). Kriteria biji kakao dengan kualitas terbaik yaitu masak penuh (kering, berwarna coklat, berbau asam, tidak purple dan slaty ketika dibelah), berat kering tidak lebih dari 1 gram, ukuran yang sama dan cangkang yang tidak pecah (Dian, 2012).

2.1.3 Kandungan Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Pada biji kakao terdapat kandungan senyawa primer di dalamnya seperti air, lemak, karbohidrat dan lainnya dapat dilihat pada tabel di bawah ini

Tabel 2.1 Komposisi kimia keping biji dan kulit biji kakao

Komposisi	Keping biji (%)	Kulit biji (%)
Air	2,1	3,8
Lemak	54,7	3,4
Abu	2,7	8,1
Nitrogen		
• N total	2,2	2,8
• N protein	1,3	2,1
• Theobromin	1,4	1,3
• Kafein	0,07	0,1
Karbohidrat		
• Glukosa	0,1	0,1
• Pati	6,1	-
• Pektin	4,1	8,0
• Serat kasar	2,1	18,6
• Selulosa	1,9	13,7
• Pentosa	1,2	7,1
• Gum	1,8	9,0
Tanin		
• Asam asetat	0,1	0,1
• Asam sitrat	-	0,7
• Asam oksalat	0,3	0,3

Sumber : Martono (2014)

Adapun senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam biji kakao yaitu berupa steroid, terpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin dan fenolik. Biji kakao yang belum melewati pengolahan memiliki senyawa polifenol sekitar 12 – 18 % dengan gugus utama flavanol, antosianin dan proantosianidin. Senyawa polifenol didominasi oleh katekin dan epilogalokateki. Polifenol di dalam biji kakao juga terdominasi oleh gugus flavonoid yaitu proantosianidin $\pm 58\%$, flavanol $\pm 37\%$ dan antosianidin $\pm 4\%$. Senyawa metabolit sekunder polifenol ini dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri untuk membunuh mikroorganisme dalam pangan atau mencegah pertumbuhannya (Sepriyani, 2020).

Theobromin di dalam biji kakao ditemukan oleh Woskresensky pada tahun 1842 dan strukturnya dibuat oleh Emil Fischer pada akhir abad ke 19. *Theobromin* berasal dari kata *Theobroma* yang awalnya dari isomer teofilin dan dikenal sebagai senyawa xanthine memiliki 2 gugus metil. Pada biji kakao sebelum diproses (terfermentasi) mengandung teobromin sekitar 14 – 38 gram dan kafein 1 – 8 gram untuk per kilogram berat kering biji kakao (Sepriyani, 2020).

2.1.4 Manfaat Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Biji kakao kebanyakan diolah menjadi suatu produk makanan atau minuman berupa coklat. Kandungan polifenol yang melimpah pada biji kakao dan produk coklat tersebut dapat berkontribusi dalam menjaga kesehatan.

a. Sumber Antioksidan

Antioksidan merupakan penghambat radikal bebas yang berada pada sistem kekebalan tubuh. Antioksidan terbagi menjadi 2 bagian yaitu antioksidan sintetis dan antioksidan alami. Antioksidan sintetis diperoleh dari terjadi reaksi kimia

tetapi tipe antioksidan ini jika diberikan dalam jangka panjang akan menyebabkan karsinogenik dalam tubuh (Andini *et al.*, 2017). Dalam beberapa penelitian mengungkapkan apabila biji kakao diolah dalam bentuk produk seperti coklat atau minuman coklat merupakan sumber antioksidan yang berbentuk senyawa katekin, epikatekin dan prosianidin. Antioksidan ini dapat mengurangi sejumlah gugus radikal bebas yang berada di dalam tubuh. Radikal bebas adalah molekul yang keberadaannya tidak stabil berasal dari proses metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, ultraviolet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lainnya (Towaha, 2014).

Menurut Towaha (2014) dalam mengonsumsi makanan atau minuman yang mengandung antioksidan dapat mengurangi peluang kemunculan penyakit degenerative dan memperlambat penuaan. Antioksidan tersebut akan merangsang respon imun dalam tubuh sehingga mampu menghambat pertumbuhan radikal bebas, mempertahankan kelenturan pembuluh darah. Sehingga dapat diartikan ketika mengonsumsi antioksidan secara langsung melindungi sel – sel maupun jaringan tubuh dari serangan radikal bebas.

b. Sumber Antikanker

Menurut Ranneh *et al* (2013) gugus fenol yang terdapat pada biji kakao banyak berperan dalam menghambat sel kanker adalah pada senyawa flavanol dan prosianidin yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan dan biosintesis poliamin dari koloni kanker. Senyawa prosianidin ini dapat menyebabkan turunnya aktivitas enzim ornithine dekarboksilase dan

sadenosilmetionin dekarboksilat yang berperan dalam biosintesis poliamin sel kanker.

c. Sumber Antidiabetes

Diabetes merupakan penyakit degeneratif yang dimana pankreas tidak dapat memproduksi insulin dengan baik sehingga menyebabkan gula dalam darah akan meningkat drastis atau disebut hiperglikemik (Luqyana & Husni, 2019). Ketika mengkonsumsi coklat gelap dengan polifenol 100 gram setiap hari dapat meningkatkan kandungan insulin yang berfungsi untuk menurunkan glukosa dalam darah sehingga dapat mengurangi terjadinya penyakit diabetes mellitus. Menurut Towaha (2014) yang terjadi saat penurunan resistensi insulin dan peningkatan insulin tersebut disebabkan oleh adanya senyawa NO (*nitric oxide*) yang keluar akibat pengaruh polifenol pada coklat.

d. Menghilangkan stress

Senyawa polifenol memiliki kemampuan untuk memperbaiki kognitif pada seseorang sehingga seseorang tersebut dapat merasa lebih rileks dan nyaman serta membantu meningkatkan konsentrasi. Senyawa metabolit polifenol ini memiliki sifat antidepresan yang dapat menciptakan suatu perasaan nyaman seperti mengurangi tingkat stress dan rasa cemas. Asupan pada polifenol dari biji kakao dapat meningkatkan serotonin yang merupakan neurotransmitter pada otak yang dapat mempengaruhi emosional seseorang menjadi lebih baik (Towaha, 2014).

2.2 Ekstraksi

Pemroduksian bahan – bahan alam untuk dijadikan sebuah keluaran obat terbaru membutuhkan proses yang saintifikasi agar obat tradisional yang telah jadi

lebih dipercaya sebab tidak hanya berdasarkan pengalaman saja tetapi juga didasarkan ilmu – ilmu ilmiah (Mukhriani, 2014). Salah satu metode ilmiah untuk menemukan suatu obat tradisional ialah ekstraksi. Metode ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan komponen yang berpindah dari padatan ke cairan atau cairan ke cairan (Santosa & Sulistiawati, 2014).

Cara kerja ekstraksi yang berasal dari tumbuhan memiliki beberapa tahap penentuannya, seperti :

- a. Tumbuhan yang akan diekstraksi terlebih dahulu melalui proses pengelompokan bagian yang akan digunakan semacam buah, bunga, daun dan lain-lain serta proses pembuatan simplisia.
- b. Pemilihan pelarut yang tepat agar senyawa yang diinginkan tidak akan rusak ketika diekstraksi.

Beberapa jenis ekstraksi yang dapat digunakan untuk proses penentuan senyawa yaitu sebagai berikut :

- a. Maserasi



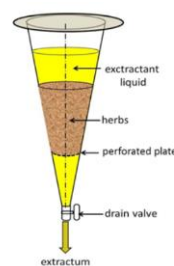
Gambar 2.8 Ekstraksi Maserasi
(Humadi & Obaid, 2020)

Maserasi merupakan salah satu metode pemisahan komponen yang tidak melalui proses pemanasan atau hanya dilakukan perendaman bahan dengan

pelarut dalam suhu ruangan (Susanty & Bachmid, 2016). Maserasi dilakukan dengan merendam simplisia tanaman dengan pelarut tertentu ke dalam wadah tertutup tanpa ada celah kemudian diletakkan pada suhu ruangan (Mukhriani, 2014). Waktu terbaik untuk proses perendaman bisa dilakukan 24 - 48 jam agar menghasilkan rendemen yang baik (Chairunnisa *et al.*, 2019).

Keuntungan dari penggunaan metode maserasi lebih mudah karena tidak perlu menggunakan pemanasan, pelarut dipilih berdasar polaritas dan kelarutan bahan sehingga pemisahan mudah dilakukan serta proses perendaman yang didiamkan akan memungkinkan banyaknya senyawa yang terekstraksi (Susanty & Bachmid, 2016). Selain keuntungan, maserasi memiliki kerugian yaitu membutuhkan waktu yang lama, tidak semua senyawa dapat terlarut dalam suhu ruang maka diperlukan juga modifikasi suhu agar proses maserasi lebih optimal (Chairunnisa *et al.*, 2019).

b. Perkolasi



Gambar 2.9 Ekstraksi Perkolasi
(Julianto, 2019)

Proses ekstraksi dengan cara mengaliri pelarut organik pada bahan tanaman yang dimana pelarut nantinya akan membawa senyawa tersebut bersamaan ini merupakan metode perkolasi (Hasrianti *et al.*, 2016). Metode perkolasi dilakukan dengan cara simplisia tanaman yang telah ditempatkan pada alat perkolasi

(perkolator) dialiri pelarut hingga aliran tersebut menetes dan ditampung pada suatu wadah di bawahnya. Perendaman pelarut perkolasi dapat dilakukan selama ± 3 jam dan hasil perendaman tersebut dialiri melalui perkolator 2 hari hingga warna aliran yang menetes tersebut berwarna bening (Hasanah *et al.*, 2015).

Keuntungan perkolasi ini pelarut yang mengalir ke dalam bahan tersebut terhitung menggunakan pelarut baru. Namun penggunaan perkolasi ini membutuhkan pelarut yang banyak, jika bahan simplisia tidak homogen maka pelarut akan sulit mengalir ke semua bagian yang harusnya teraliri, dan metode perkolasi membutuhkan waktu yang banyak (Mukhriani, 2014).

c. Infusa



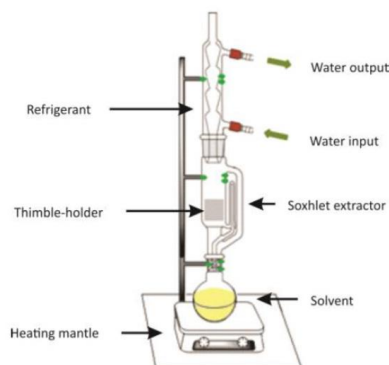
Gambar 2.10 Panci Infus dan Penangas
(Leonardy *et al.*, 2019)

Ekstraksi dengan metode pemanasan yang sederhana yaitu metode ekstraksi infusa merupakan metode yang hampir sama dengan menggunakan bahan alam seperti tumbuhan direbus menggunakan air pada suhu tertentu (Sutrisna *et al.*, 2010). Proses kerja infusa meliputi pemanasan simplisia bahan yang digunakan menggunakan pelarut air pada suhu 90°C dalam waktu 15 menit. Waktu 15 menit tersebut dihitung saat suhu mencapai 90°C sambil diaduk beberapa kali

(Khafidhoh *et al.*, 2015). Simplisia yang telah direbus kemudian disaring dan dievaporasi agar mengurangi pelarut dalam infusa tersebut (Leonardy *et al.*, 2019).

Metode infusa yang begitu sederhana dan hanya membutuhkan biaya sedikit juga memiliki kerugian meliputi zat atsiri akan hilang akibat penguapan, zat akan kembali mengendap jika kelarutannya menjadi sangat jenuh dan beberapa simplisia tidak dapat menggunakan metode ini karena zat-zat di dalamnya tidak tahan terhadap pemanasan yang lama (Karim, 2014)

d. Sokletasi



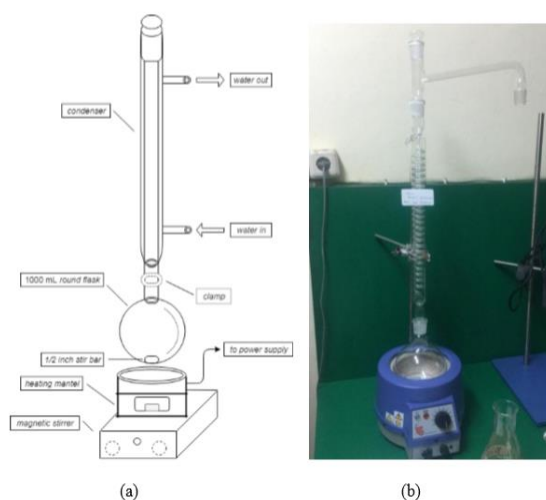
Gambar 2.11 Alat ekstraksi sokletasi
(Guntero *et al.*, 2017)

Adapun metode lain dari ekstraksi yaitu sokletasi. Sokletasi merupakan metode yang menggunakan pelarut organik yang dialiri secara berulang pada suhu dan jumlah pelarut tertentu (Zain *et al.*, 2016). Bahan simplisia yang telah dibungkus menggunakan kertas saring diletakkan pada timbal yang terletak di bawah kondensor, yang juga pelarut tertentu dituangkan dalam timbal tersebut (Zain *et al.*, 2016). Penuangan berulang pada metode ini dapat dilakukan hingga pelarut tidak menghasilkan warna lagi. Hal tersebut dapat dilakukan sekitar 2 jam

dengan pemanasan pada suhu tidak lebih dari 70°C dan didapat ± 5 siklus ekstraksi hingga warna pelarut memudar (Zain *et al.*, 2016).

Sokletasi menggunakan metode pemanasan dengan menghasilkan ekstrak yang lebih banyak, tidak membutuhkan waktu yang sangat lama seperti perkolasi dan maserasi, juga pelarut yang digunakan dalam sokletasi ini lebih sedikit, siklus pemanasan pelarut berulang tersebut menyebabkan sampel terkestraksi secara sempurna (Puspitasari dan Proyogo, 2013). Kerugian sokletasi ini terdapat pada senyawanya yang terdegradasi karena berada pada titik didih terus-menerus sehingga menyebabkan senyawa tersebut dapat mudah dirusak (Mukhriani, 2011)

e. Refluks



Gambar 2.12 Alat ekstraksi refluks
(Hidayat *et al.*, 2019)

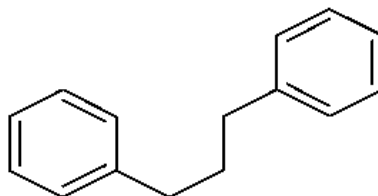
Refluks memiliki prinsip yang hampir sama dengan sokletasi tetapi disini bedanya pada sokletasi pelarut yang digunakan dengan sampel terpisah sedangkan pada refluks pelarut langsung dicampur dengan sampel terbatas dalam temperatur dan waktu tertentu yang relatif tetap dengan adanya water in dan water out (pendinginan balik) (Hasrianti *et al.*, 2016). Penerapan suhu pada metode refluks

sekitar 60°C dengan lama pemanasan 3 jam akan menghasilkan ekstrak cair yang nantinya akan dipanaskan Kembali diatas *water bath* untuk menghasilkan ekstrak kental (Syamsul *et al.*, 2020). Pada prinsipnya pelarut yang diletakkan pada tabung alas bulat tersebut akan menguap saat suhu tinggi tetapi akan didinginkan ketika melewati kondensor dan menjadi embun kemudian masuk ke dalam tabung alas bulat Kembali sehingga pelarut yang menguap tadi tidak akan hais selama proses refluks (Susanty & Bachmid, 2016).

Menurut Putra *et al.* (2014) keuntungan dari metode refluks dibanding dengan maserasi yaitu hanya membutuhkan waktu yang tidak lama dan dibandingkan dengan sokletasi, pelarut yang digunakan refluks ini hanya membutuhkan sedikit.

2.3 Senyawa Flavonoid

2.3.1 Deskripsi Senyawa Flavonoid



Gambar 2.13 Struktur Flavonoid
(Wahyulianingsih *et al.*, 2016)

Flavonoid merupakan sebuah metabolit sekunder dari golongan plifenol yang larut dalam air dan ditemukan luas pada tanaman dan makanan serta memiliki efek bioaktif termasuk farmakologi. Senyawa flavonoid disajikan secara luas di dalam berbagai tumbuhan hijau dengan laporan lebih dari 9.000 senyawa flavonoid pada suatu ekstrak tumbuhan tersebut. Flavonoid berada pada sebuah tanaman yang ikut serta dalam memproduksi pigmen berwarna kuning, merah,

orange, biru dan ungu baik itu dari buah, bunga atau daun (Arifin & Ibrahim, 2018).

Flavonoid dapat diklasifikasikan ke dalam beberapa senyawa yaitu flavon, flavonol, katekin, flavanol dan antosianin. Beberapa kelompok senyawa flavonoid ini terbagi berdasarkan perbedaan struktur terutama pada substitusi karbon pada gugus aromatic sentral dengan bermacam aktivitas farmakologis yang ditimbulkan (Alfaridz & Amalia, 2015). Senyawa flavonoid memiliki 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$ yang artinya yaitu kerangka karbon dari flavonoid terdiri dari dua gugus C_6 kemudian tersambung oleh rantai alifatik tiga karbon (Arifin & Ibrahim, 2018). Flavonoid dapat dibagi menjadi 3 macam yaitu :

- a. Flavonoid memiliki cincin ke-tiga yaitu gugus piran. Flavonoid jenis ini dapat disebut flavan atau fenilbenzopiran biasanya turunan ini dapat digunakan sebagai astringen
- b. Flavonoid memiliki cincin ke-tiga yaitu gugus piron. Flavonoid jenis ini dapat disebut flavon atau fenilbenzopiron biasanya turunan ini dapat digunakan berbagai jenis aktivitas farmakologi
- c. Flavonoid memiliki cincin ke-tiga yaitu gugus prilium. Flavonoid jenis ini disebut flavilium atau antosianin biasanya turunan ini dapat digunakan sebagai pewarna alami.

2.3.2 Sifat Fisika dan Kimia Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang bersifat kimia agak asam dan dapat larut dalam basa, bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut metanol, etanol, air atau butanol. Adanya gugus glikosida yang terikat dengan struktur

gugus flavonoid maka menyebabkan flavonoid mudah larut dalam air. Flavonoid berada pada sebuah tanaman yang ikut serta dalam memproduksi pigmen berwarna kuning, merah, orange, biru dan ungu baik itu dari buah, bunga atau daun (Arifin & Ibrahim, 2018). Selain erat dengan sifat di atas, sifat lain yang dimiliki flavonoid adalah hepatoprotektif, antiinflamasi, antivirus dan sifat utama dari flavonoid adalah antiradikal terhadap radikal hidroksil, anion superoksida, radikal peroksil dan alkoksil.

Flavonoid merupakan senyawa yang larut dalam air dapat diekstraksikan dengan etanol 70% dan stabil dalam lapisan air setelah ekstrak dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid yang berupa senyawa fenol, warnanya akan berubah apabila ditambahkan dengan basa atau ammonia sehingga mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan (Alwi, 2017).

Pada penelitian Widiyanto (2007) Kelarutan dari flavonoid umumnya pada bentuk glikosida maupun flavonoid bentuk bebas akan larut ke dalam pelarut etanol dan metanol. Namun untuk pemisahan senyawa dari golongan flavonoid ini berdasarkan dengan sifat kelarutannya yaitu :

- a. Pada flavonoid bentuk bebas atau bentuk aglikon umumnya larut dalam pelarut eter
- b. Pada flavonoid O-glikosida banyak larut ke dalam pelarut etil asetat
- c. Pada flavonoid O-glikosida larut ke dalam pelarut n-butanol, amil alkohol

2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode merupakan sebuah penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan di laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter

tersebut memenuhi persyaratan penggunaannya (Harmono, 2020). Validasi metode analisis ini adalah salah satu penjaminan mutu analisis secara kuantitatif. Pada metode analisis harus tervalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter – parameter ini cukup mampu mengatasi permasalahan analisis, dikarenakan suatu metode harus divalidasi ketika :

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi masalah pada analisis tertentu
- b. Metode yang telah baku dapat direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau adanya sebab lain yang mengarah bahwa metode baku tersebut harus diperbaiki
- c. Penjaminan mutu dengan indikasi bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu
- d. Metode baku digunakan saat di laboratorium yang dikerjakan dengan alat yang berbeda

Berdasarkan USP, terdapat beberapa parameter analisis yang dipertimbangkan dalam validasi metode analisis sebagaimana yang dijelaskan di bawah ini (Harmono, 2020)

- a. Kecermatan (*accuracy*)

Akurasi merupakan sebuah metode analisis ketelitian antara nilai yang terukur dengan nilai yang diterima baik secara nilai konvensi, nilai yang sebenarnya atau nilai rujukan. Akurasi ini dinyatakan sebagai % rekovery atau persen perolehan kembali. Pada uji suatu senyawa obat, akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan standar.

ICH (*Conference on Harmonization*) mengumpulkan data dari 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda kemudian data dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali atau % *recovery*

Tabel 2.2 Perbandingan Konsentrasi Analit dengan Akurasi

Analit pada matriks sampel	Rasio analit	Unit	Rerata % <i>recovery</i>
100	1	100%	98 – 102
≤ 10	10^{-1}	10%	98 – 102
≤ 1	10^{-2}	1%	97 – 103
$\leq 0,1$	10^{-3}	0,1%	95 – 105
0,01	10^{-4}	100 ppm	90 – 107
0,001	10^{-5}	10 ppm	80 – 110
0,0001	10^{-6}	1 ppm	80 – 110
0,00001	10^{-7}	100 ppb	80 – 110
0,000001	10^{-8}	10 ppb	60 – 155
0,0000001	10^{-9}	1 ppb	40 - 120

Sumber : Alwi (2017)

Akurasi ditentukan dengan dua metode yaitu simulasi dan metode penambahan baku. Pada metode simulasi, sejumlah analit sebagai bahan pembanding kimia ditambahkan dengan campuran placebo kemudian campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit (bahan pembanding). Sedangkan jika dengan metode penambahan baku, sampel dengan jumlah tertentu dianalisis yang telah tercampur dengan analit dan dianalisis lagi (Harmita, 2004).

b. Keseksamaan (*precision*)

Presisi merupakan ukuran dengan menunjukkan derajat kesesuaian melalui penyebaran hasil individual dari rata – rata apabila prosedur diterapkan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran homogen (Harmita, 2004).

Menurut ICH, presisi harus dilakukan menggunakan 3 tingkatan yang berbeda yaitu :

1. Keterulangan (*repeatability*) ini merupakan sebuah ketepatan kondisi percobaan yang sama atau berulang baik pada orangnya, alat yang digunakan, tempat atau pada waktu. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel yang identik terpisah dari kelompok yang sama.
2. Presisi antara (*intermediate precision*) merupakan ketepatan kondisi percobaan dengan berbeda pada orang, alat yang digunakan, tempat maupun waktu.
3. Ketertiruan (*reproducibility*) merupakan hasil – hasil dari laboratorium yang lain. biasanya pada *reproducibility*, analisis dilakukan pada laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut dan analisis yang juga berbeda. Analisis ini dilakukan pada sampel yang diduga identic yang dicuplik dari kelompok yang sama.
4. Data dari presisi mencakup simpangan baku, simpangan baku relative (RSD), koefisien variasi (CV) dan kisaran kepercayaan.

Pada awalnya, pengujian presisi tersebut hanya sering menggunakan 2 parameter di awal validasi metodenya yaitu keterulangan dan presisi antara sedangkan ketertiruan digunakan ketika akan melakukan sebuah uji banding antara laboratorium.

Presisi yang mencakup tentang standar deviasi (SD) dan standar deviasi relatif (RSD) memiliki rumusnya masing – masing daapt dilihat sebagai berikut

$$SD = \sqrt{\frac{(\sum (x - \bar{x})^2)}{n - 1}}$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Rumus di atas merupakan rumus dari standar deviasi dimana jumlah dari hasil analisis dikurangi rata – rata hasil analisis itu sendiri kemudian dikuadratkan dua kemudian n disana merupakan jumlah dari sampel yang dianalisis dan dikurangi satu. KV atau RSD atau standar deviasi relatif menggunakan rumus hasil dari perhitungan SD dibagi rata – rata yang diuji dikali 100%.

Tabel 2.3 Perbandingan Konsentrasi Analit dengan Presisi

Analit pada matriks sampel	Rasio analit	Unit	RSD (%)
100	1	100%	< 1,3
10	10 ⁻¹	10%	< 1,8
1	10 ⁻²	1%	< 2,7
0,1	10 ⁻³	0,1%	< 3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	< 5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm	< 7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	< 11
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	< 15
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb	< 21
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	< 30

Sumber : Alwi (2017)

Data hasil uji presisi biasanya dikumpulkan sebagai bagian dari jaian lain yang berikatan dengan presisi seperti linieritas atau akurasi. Replikasi 6 – 15 kali yang dilakukan pada sampel tunggal untuk konsentrasinya. Pada uji KCKT, nilai RSD antar 1 – 2% diberikan syarat untuk senyawa – senyawa aktif dalam jumlah banyak, sedangkan senyawa dengna kadar yang sedikit, RSD bernilai 5 – 15% (Alwi, 2017).

c. Spesifisitas

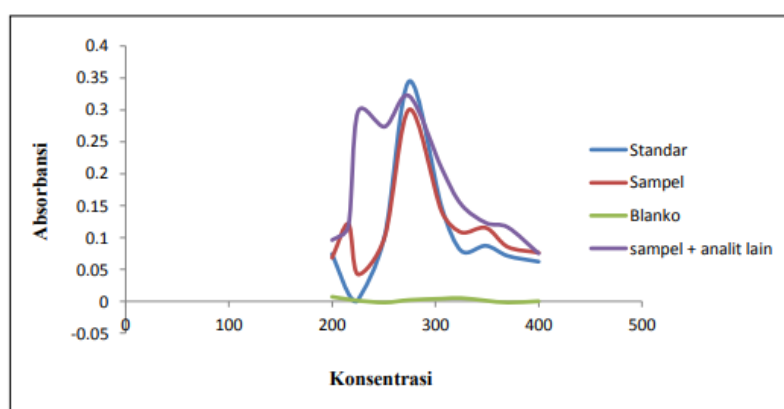
Spesifisitas adalah kemampuan mengukur analit secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi dan komponen matriks (Deovita, 2018). Spesifisitas dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan metode terhadap sampel yang mengandung bahan berupa cemaran, senyawa yang sejenis atau asing dan dibandingkan dengan hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan asing lainnya.

ICH membagi 2 spesifisitas yaitu uji identifikasi dan uji kemurnian. Pada uji identifikasi, spesifisitas diperlihatkan dengan kemampuan metode analisis untuk membedakan antara senyawa yang mempunyai struktur molekul yang hamper sama sedangkan pada uji kemurnian memiliki tujuan spesifisitasnya ditunjukkan oleh daya pisah 2 senyawa yang dekat. Senyawa tersebut merupakan komponen utama dan pengotor. Jika dalam sebuah uji terdapat pengotornya seharusnya uji tersebut tidak terpengaruh dengan adanya pengotor ini (Alwi, 2017).

Penentuan spesifisitas dapat dilakukan dengan dua jalan yaitu pertama dengan melakukan optimasi sehingga mendapatkan senyawa yang terpisah dengan baik dari senyawa – senyawa lainnya dan jalan yang kedua menggunakan detektor selektif khususnya untuk senyawa yang terelusi bersamaan (Alwi, 2017). Penggunaan detektor ultraviolet pada panjang gelombang yang spesifik merupakan cara yang efektif untuk perhitungan selektifitas. Nilai resolusi yang dipergunakan untuk parameter menunjukkan selektifitas pada metode analisis berdasarkan pemisahan antara *peak* (puncak) dengan nilai yang baik yaitu ≤ 2 atau

nilai $R_s \leq 1,5$ telah dapat menunjukkan bahwa pemisahan puncak tersebut baik (Sugihartini *et al.*, 2014).

Pada spesifisitas, nantinya akan dilakukan sebuah perbandingan antara spektrum dari standar dan spektrum sampel. Terdapat contoh di bawah ini dari *overlay* spektra spesifisitas pada sebuah penelitian dengan membandingkan standar, sampel, blanko dan sampel yang dicampur dengan analit lain.



Gambar 2.14 Contoh spektrum spesifisitas
(Wardani, 2021)

d. Batas Deteksi (*Limit Of Detection*)

Limit Of Detection atau LOD merupakan salah satu parameter uji batas terkecil yang digunakan untuk mengukur sejumlah analit tertentu oleh suatu instrument (Sumarno & Kusumaningtyas, 2018). Pada umumnya maksud dari LOD digunakan dalam kimia analisis adalah kadar analit yang memberikan respon sebesar blanko (Y_b) ditambah dengan tiga simpangan baku blanko ($3S_b$).

Penentuan LOD menggunakan metode *signal to noise* sedangkan menurut ICH, batas deteksi juga menggunakan dua metode yaitu non instrumental visual dan metode perhitungan. Perhitungan LOD berdasarkan pada standar deviasi (SD), *slope* (respon kemiringan), dengan rumus LOD yaitu $3,3 \times \frac{SD}{S}$. Standar

deviasi pada respon dapat ditentukan dari standar deviasi blanko, pada SD residu dari garis regresi atau SD intersep Y pada garis regresi (Harmita, 2004).

e. Limit Kuantifikasi (*Limit Of Quantification*)

Limit Of Quantification atau LOQ adalah jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat diukur dengan akurat dan presisi oleh sebuah instrument (Sumarno & Kusumaningtyas, 2018). Sebagaimana LOD, LOQ juga menggunakan *signal to noise* dengan rasio 10:1, namun perlu diingat bahwa LOQ merupakan sebuah kerja sama antara konsentrasi dengan presisi dan akurasi yang merupakan syaratnya. Sehingga jika konsentrasi LOQ turun maka presisi tersebut juga akan menurun begitu juga sebaliknya (Alwi, 2017).

Sama hal seperti LOD, *International Conference on Harmonization* (ICH) mengenalkan metode rasio *signal to noise* dan menggunakan 2 metode lainnya yaitu non instrumental dan metode perhitungan. Untuk rumus LOQ yaitu $10 \times \frac{SD}{S}$. Dimana standar deviasi respon dapat ditentukan dengan standar deviasi pada blanko dengan standar deviasi residual garis regresi linier.

f. Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan pada metode uji untuk menghasilkan uji yang proporsional terhadap kepekatan analit sampel dalam jarak kepekatan yang ada. Uji linieritas ini digunakan untuk memastikan pada suatu uji terdapat hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respon detektor (Mulyati *et al.*, 2011). Koefisien korelasi (r) dapat menunjukkan sebagai tingkat analit tersebut linier dengan kadar luas area puncak. Menurut Sugihartini *et al.* (2014) analit dikatakan linier apabila nilai r atau koefisien korelasinya lebih besar daripada r

tabel. Sedangkan menurut Budari *et al.* (2015) suatu analit menghasilkan nilai linier apabila r (koefisien korelasi) = 1 atau $r = -1$.

Biasanya pada linieritas dihitung berdasarkan persamaan data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan banyaknya konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk mendapat hubungan yang seimbang antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit tersebut maka diolah melalui transformasi matematik terlebih dahulu sebelum dibuat analisis regresinya (Harmita, 2004). Data linieritas dapat diproses dengan metode kuadrat terkecil kemudian selanjutnya dapat ditentukan nilai *Slope*, intersep dan koefisien korelasinya (Alwi, 2017).

g. Ketangguhan metode (*Ruggedness*)

Ruggedness merupakan ketertiruan pada hasil uji yang didaaptkan dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal seperti pada laboratorium, analisis, instrument, pereaksi dan suhu yang berbeda (Alwi, 2017). Strategi untuk menentukan *ruggedness* ini bervariasi tergantung kompleksitas sebuah metodenyya dan waktu yang tersedia untuk melakukan validasi. Penentuan ketangguhan metode dapat dipersingkat oleh kondisi percobaan yang kurang baik, contohnya seperti pengecekan pengaruh kolom kromatografi yang berbeda pabrik dan jenisnya sama. Pada permasalahan ini semua faktor harus menetap seperti fase gerak dan reagen yang digunakan.

h. Ketahanan (*Robustness*)

Robustness merupakan salah satu metode lagi pada validasi metode analisis yang tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil (Alwi,

2017). Pada proses ketahanan untuk memvalidasinya dapat dilakukan variasi parameter – parameter metode seperti persentase pelarut organik pH, kekuatan ionik dan suhu. Sebagai contoh pada instrument HPLC dapat mencakup perubahan komposisi organik fase gerak 1%, pH fase gerak $\pm 0,2$ unit dan temeptratur kolom $\pm 2 - 3^{\circ}\text{C}$. perubahan – perubahan ini dapat dilakukan sesuai dengan laboratorium (Harmita, 2004).

2.5 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan suatu instrument analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik sinar UV (ultraviolet) dan sinar tampak (Visible) dengan menggunakan instrument spektrofotometer (Rahayu *et al.*, 2009). Cahaya dari ultraviolet tidak dapat dilihat oleh mata manusia, namun pada hewan seperti burung dan reptile dapat melihat panjang gelombang sinar UV. Rentang panjang gelombang UV sendiri berkisar 190 - 380 nm, cahaya visible 380 -780 nm (Suhartati, 2017).

Kelebihan penggunaan Spektrofotometri UV-Vis ini dapat digunakan untuk menganalisis zat – zat organik atau anorganik, selektif, ketelitiannya yang tinggi dengan kesalahan sebesar 1 – 3%, menganalisis menggunakan instrument spektrofotometri UV-Vis juga mudah mendapatkan hasil yang cukup akurat dan intrumen ini dapat digunakan sebagai penetapan kuantitas zat yang sangat kecil (Rohmah *et al.*, 2021). Namun dari kelebihan tersebut, Spektrofotometri UV-Vis memiliki kekurangan yaitu senyawa yang dianalisis harus memiliki gugus kromofor dengan ikatan rangkap terkonjugasi, memiliki panjang gelombang yang tersampaikan pada daerah ultraviolet atau daerah visible, pH larutan, suhu dan zat

pengotor dapat mempengaruhi hasil dari absorbansi yang terukur (Tetha & Sugiarto, 2016).

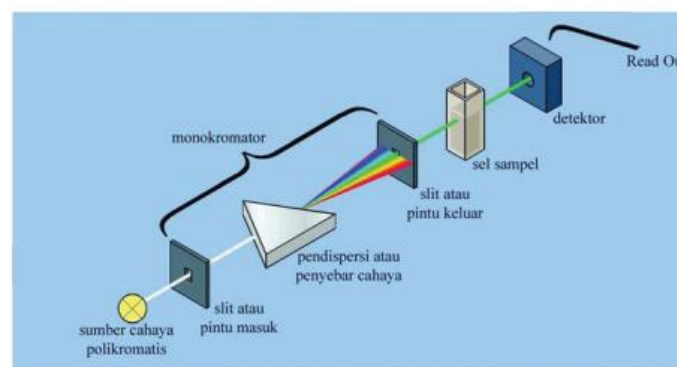
Prinsip kerja dari spektrofotometri UV-Vis ini adalah ketika terdapat sumber cahaya berupa monokromatik diteruskan melalui suatu media yang merupakan sebuah sampel, maka sebagian cahaya tersebut ada yang diserap, ada yang dipantulkan dan ada pula yang diteruskan (Yanlinastuti & Fatimah, 2016). Radiasi UV dan visible diabsorpsi oleh molekul organik aromatik, molekul mengandung elektron- π rekonjugasi dan atom mengandung elektron-n menyebabkan transisi elektron di garis orbit luarnya dari tingkat energy elektron dasar ke tingkat energy elektron tereksitasi lebih besar. Dalam spektrofotometri UV-Vis terdapat beberapa istilah seperti kromofor, auksokrom, efek batokromik, efek hipokromik, hipsokromik. Dapat diuraikan sebagai berikut :

- a. Gugus kromofor merupakan gugus atom dalam sebuah senyawa yang dapat melewati panjang gelombang ultraviolet yang biasanya pada senyawanya terdapat ikatan rangkap (Sylvia *et al.*, 2018). Sebagai contoh dari gugus kromofor adalah heksana, aseton, benzene, karbondioksida, karbinil dan gas nitrogen.
- b. Auksokrom merupakan gugus atom jenuh yang apabila terikat dengan gugus kromofor dapat mengubah panjang gelombang dan intensitas serapaman maksimal. Ciri dari auksokrom yang langsung berikatan dengan kromofor adalah OCH_3 , $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$, NH_2 (Retnani *et al.*, 2010).

- c. Efek batokromik (pergeseran merah) merupakan kejadian perubahan absorbansi panjang gelombang ke arah yang lebih besar, hal ini diakibatkan aoksokrom yang berikatan dengan kromofor (Suhartati, 2017).
- d. Efek hipokromik (pergeseran biru) yaitu sebuah perubahan absorpsi ke panjang gelombang yang lebih pendek. Hal ini disebabkan oleh pelarut atau tidak adanya aoksokrom pada kromofor (Suhartati, 2017).
- e. Hipsokromik merupakan sebuah perubahan pergeseran ke panjang gelombang yang lebih kecil (Tunnisa *et al.*, 2018).

2.5.1 Tipe Spektrofotometri UV-Vis

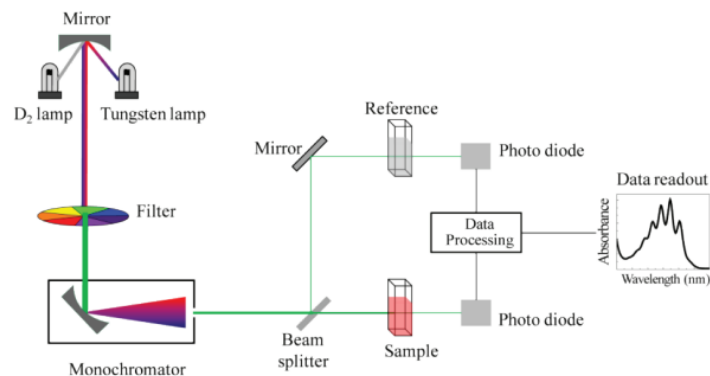
Terdapat dua tipe yang umum digunakan pada spektrofotometri UV-Vis yaitu *single beam* dan *double beam*. *Single beam* merupakan tipe instrument yang digunakan percobaan kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal (*single*). Keuntungan penggunaan *single beam* ini adalah harganya yang murah atau hemat biaya dan sederhana.



Gambar 2.15 Alat spektrofotometri UV-Vis (*single beam*)
(Suhartati, 2017)

Sedangkan pada *double beam* merupakan tipe instrument yang digunakan untuk kauntitatif memiliki dua sinar terbentuk dari potongan cermin berbentuk V.

Sumber cahaya polikromatis untuk sinar ultraviolet menggunakan lampu deuterium dan untuk visible menggunakan lampu wolfram (Alwi, 2017).



Gambar 2.16 Alat spektrofotometri UV-Vis (*double beam*)
(Suhartati, 2017)

Pada spektrofotometri UV-Vis, monokromator menggunakan lensa prisma dan filter optik. Wadah sampel yang menggunakan kuvet terbuat dari kuarsa dengan lebar bervariasi. Detektor berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan diubah menjadi alur listrik (Suhartati, 2017).

2.5.2 Syarat Pengukuran

Menurut Suhartati (2017) pada umumnya, sampel yang digunakan berupa larutan tersebut diperhatikan beberapa syaratnya seperti harus melarutkan sampel dengan sempurna, pelarut yang digunakan tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi dan tidak berwarna, pastikan tidak terjadi interaksi dengan senyawa molekul yang akan dianalisis serta kemurnian tersebut harus tinggi.

Tabel 2.4 Serapan sinar UV pada λ_{maks}

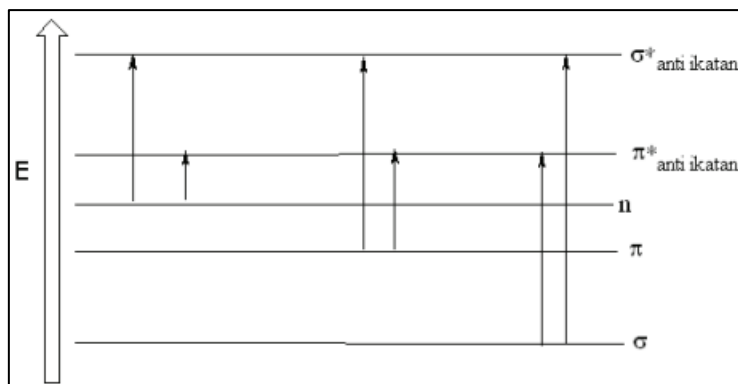
Pelarut	$\lambda_{\text{maks.}}, \text{ nm}$	Pelarut	$\lambda_{\text{maks.}}, \text{ nm}$
Asetronitril	190	n- heksana	201
Kloroform	240	Metanol	205
Sikloheksana	195	Isooktana	195
1-4 dioksan	215	Air	190
Etanol 95 %	205	Aseton	330
Benzena	285	Piridina	305

Sumber : Suhartati (2017)

Pelarut yang sering digunakan dalam uji instrument spektrofotometri UV-Vis adalah air, etanol, metanol dan n-heksana. Hal ini disebabkan pelarut – pelarut tersebut memiliki warna transparan pada daerah UV. Untuk mendapatkan spectrum UV-Vis yang tepat perlu diperhatikan juga pada konsentrasi sampelnya. Hubungannya yaitu absorbansi kepada konsentrasi sampel tersebut akan linier apabila nilai absorbansi larutan sampel antara 0,2 – 0,8 (hukum Lambert-Beer) dan besaran absorbansi pada senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi mengalami eksitasi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$, ϵ 10-100, maka diketahui konsentrasi senyawany sekitar 10^{-2} mol/L.

2.5.3 Interaksi sinar UV-Vis dengan Senyawa

Keterikatan natar cahaya ultraviolet atau visible menghasilkan transisi elektronik dari elektron ikatan baik ikatan sigma (σ) dan pi (π) ataupun non ikatan (n) yang berada di dalam molekul organik. Transisi tersebut merupakan perpindahan elektron orbital ikatan atau non ke tingkat orbital anti ikatan (tingkat eksitasi). Tingkat eksitasi dari elektron molekul organik memiliki dua jenis yaitu sigma bintang (σ^*) dan pi bintang (π^*) sehingga jika molekul organik memiliki dua jenis elektron tersebut maka tipe transisi elektronnya meliputi $\sigma \rightarrow \sigma^* \rightarrow \pi^* \rightarrow \pi \rightarrow \pi^* \rightarrow \pi \rightarrow \sigma^* \rightarrow n \rightarrow \sigma^* \rightarrow n \rightarrow \sigma^*$ (Suhartati, 2017).



Gambar 2.17 Tipe transisi elektron dalam molekul organik
(Suhartati, 2017)

Dalam hal ini, supaya mengalami sebuah transisi elektronik maka diperlukan energi yang besar sesuai dengan jenis elektron ikatan dan non ikatan yang ada dalam molekul organik. Hal ini dapat dihitung menggunakan persamaan Planck sebagai berikut :

$$E = h \times \nu = h \times C / \lambda$$

Keterangan :

E : energi

ν : frekuensi

C : kecepatan cahaya ($3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$)

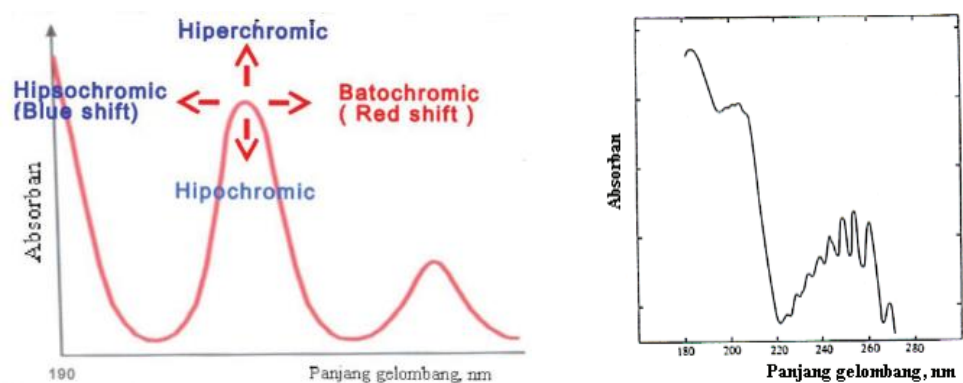
h : tetapan Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}$)

λ : panjang gelombang

Panjang gelombang yang mencapai sinar ultraviolet dari 100 – 400 nm dan untuk sinar tampak (visible) 400 – 750 nm serta sinar tersebut dimulai dari tidak berwarna ungu – ungu – merah. Senyawa organik yang memiliki ikatan sigma, akan mengabsorpsi panjang gelombang ultraviolet di bawah 200 nm sedangkan molekul organik dengan ikatan π (phi) akan mengabsorpsi pada panjang gelombang yang lebih besar (Suhartati, 2017).

2.5.4 Spektrum UV-Vis

Suatu spektrofotometri tersusun dari sumber spectrum sinar tampak yang sinambung dan monokromatis. Spektrum UV-Vis dapat dilihat dalam bentuk dua dimensi dengan absis yaitu panjang gelombang dan ordinat berupa absorban (Rohmah *et al.*, 2021). Spektrum Uv-Vis berupa pita lebar yang disebabkan oleh energy yang terabsorpsi, selain itu juga karena transisi rotasi elektron dan vibrasi elektron ikatan di dalam molekul.



Gambar 2.18 Gambaran Spektrum UV-Vis
(Suhartati, 2017)

Semakin banyak sinar yang diabsorpsi oleh sampel pada panjang gelombang tertentu maka semakin tinggi pula absorban. Pernyataan ini dapat dijelaskan ke dalam rumus hukum Lambert-Beer

$$A = \log I_0/I = a \cdot b \cdot c = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan :

A = absorban

a = absorptivitas ($\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

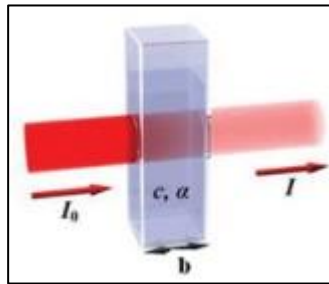
b = lebar sel yang dilalui sinar (cm)

c = konsentrasi (mol/L)

ϵ = ekstinsi molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

I_0 = intensitas sinar sebelum melalui sampel

I = intensitas sinar sesudah melalui sampel

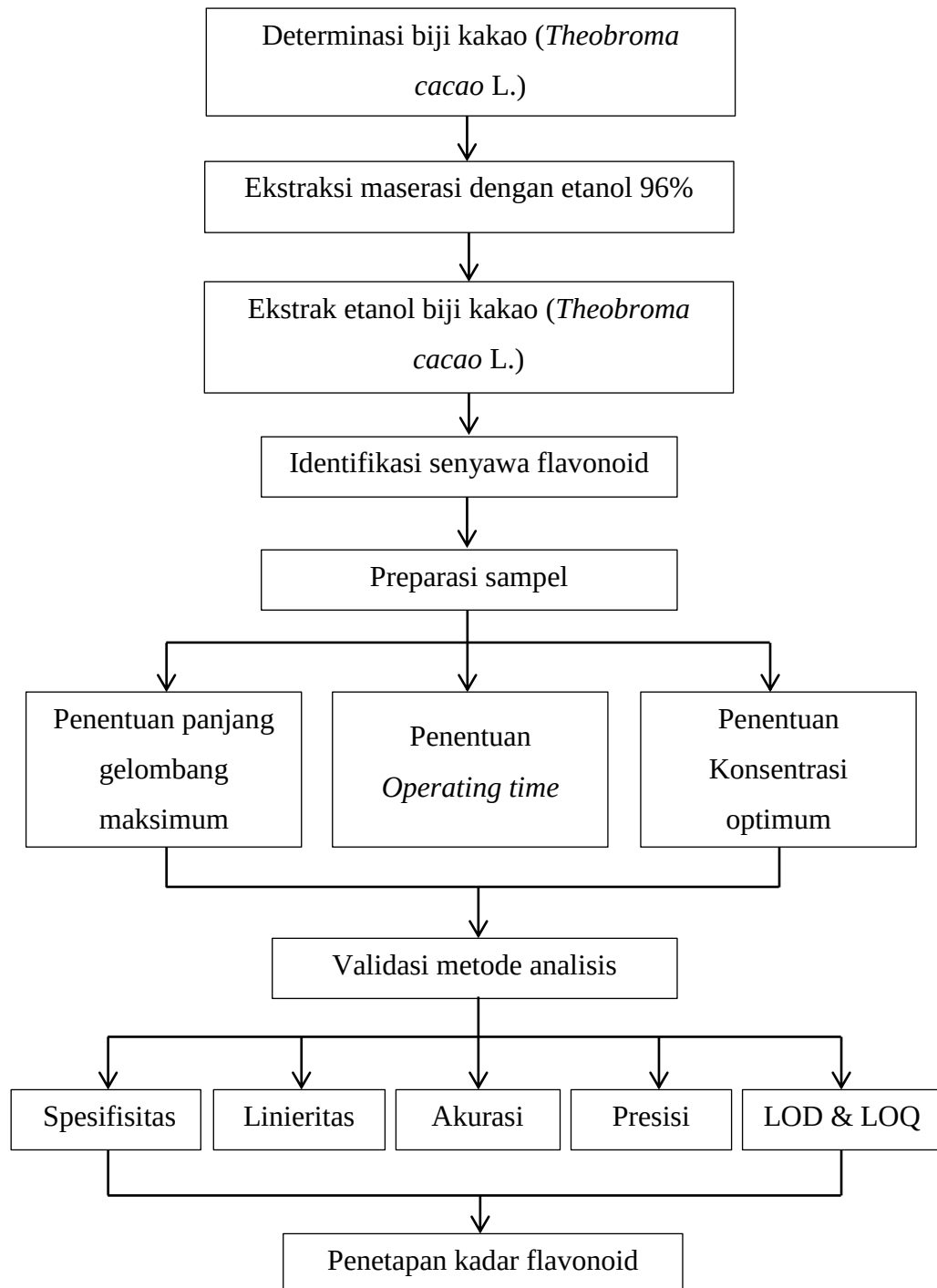


Gambar 2.19 Absorbansi sinar UV-Vis
(Suhartati, 2017)

Gambar di atas merupakan bentuk dari sebuah larutan sampel yang berada di dalam kuvet kemudian mengalami sebuah absorbsi dari sinar UV-Vis. Perbandingan logaritma I_0 dengan I menyatakan besaran sinar tersebut diabsorpsi oleh sampel seberapa banyak (Alwi, 2017). Nilai ekstinsi dapat dihitung berdasarkan spektrum UV-Vis menggunakan persamaan Lambert-Beer, nilai ekstinsi molar sangat penting dalam penentuan struktur dikarenakan hal tersebut terkait dengan transisi elektron yang diizinkan atau dilarang. Dari nilai tersebut akan didapatkan kromofor dari senyawa yang dianalisa. Dengan menghitung menggunakan rumus persamaan Lambert-Beer dapat dihitung berapa konsentrasi suatu senyawa dalam suatu pelarut tersebut (Suhartati, 2017).

BAB III. KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep

3.2 Hipotesis

Hipotesis penelitian adalah dugaan sementara atau jawaban sementara dari rumusan masalah yang telah dibuat (Sugiyono, 2014). Hipotesis dari penelitian ini yaitu validasi metode analisis pada penetapan kadar flavonoid ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat memenuhi persyaratan parameter-parameter validasi metode analisis yaitu spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantitation* (LOQ).

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Menurut Sugiyono (2017) desain penelitian adalah suatu cara ilmiah untuk mendapatkan data dengan tujuan dan kegunaan tertentu. Penelitian ini menggunakan desain penelitian kuantitatif.

Penelitian kuantitatif adalah metode penelitian yang berlandaskan pada filsafat, digunakan untuk meneliti pada populasi datau sampel tertentu, pengumpulan data menggunakan instrument penelitian, analisis data bersifat kuantitatif atau statistic, dengan tujuan untuk menguji hipotesis yang telah ditetapkan (Sugiyono, 2017).

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium dalam uji validasi metode spektrofotometri UV-Vis dan penetapan kadar flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas objek atau subjek yang mempunyai kuantitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh penelitian untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2001:55). Populasi pada penelitian ini adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember.

4.2.2 Sampel

Menurut Sugiyono (2001:56) sampel adalah sebagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi. Sampel dari penelitian ini adalah bagian biji dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel *dependent* (terikat)

Variabel *dependent* adalah variabel yang dijadikan sebagai faktor yang dipengaruhi oleh sebuah atau sejumlah variable lain (Haqul, 1989). Variabel *dependent* dari penelitian ini ialah ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.3.2 Variabel *independent* (bebas)

Variabel *independent* adalah variabel yang berperan memberi pengaruh kepada variable lain (Haqul, 1989). Variabel *independent* pada penelitian ini ialah validasi metode analisis dan penetapan kadar flavonoid.

4.4 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember untuk melakukan proses ekstraksi serbuk biji kakao (*Theobroma cacao* L.), kemudian akan dilanjutkan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember.

4.5 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari hingga Mei 2022.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah suatu definisi yang diberikan kepada suatu variabel dengan cara memberikan arti atau menspesifikasikan kegiatan ataupun memberikan suatu operasional yang diperlukan untuk mengukur variable tertentu. Definisi operasional digunakan untuk memberikan batasan dan pengertian yang jelas tentang variabel sehingga dapat menghindari terjadinya kesalah fahaman mengenai data yang dikumpulkan (Nazir, 1999). Adapun definisi operasional dari penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 4.1 Definisi operasional

Variabel penelitian	Definisi operasional	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala
Variabel bebas / Independent					
Ekstrak etanol	Hasil ekstraksi biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%	Timbangan analitik	Menghitung persen rendemen hasil ekstrak	Dinyatakan dalam persen	Ratio
Variabel terikat / Dependent					
Validasi metode analisis	Validasi metode analisis merupakan satu tindakan penilaian terhadap parameter	Spektrofotometer UV-Vis	1. Spesifisitas : membandingkan spectra sampel dan standar 2. Linieritas	1. Dinyatakan dalam satuan mg/L 2. Dinyatakan dalam nilai r	Ratio

	yang melalui percobaan di laboratorium untuk pembuktian bahwa suatu parameter tersebut memenuhi syarat penggunaannya		: menghitung nilai r 3. Akurasi : menghitung persentase recovery 4. Presisi : menghitung nilai koefisien variasi 5. LOD & LOQ : menghitung konsentrasi terkecil	3. Dinyatakan dalam persen recovery 4. Dinyatakan dalam persen RSD 5. Dinyatakan dalam satuan mg/L	
Penetapan kadar flavonoid	Penetapan kadar flavonoid adalah penetapan jumlah kandungan total senyawa flavonoid dari ekstrak etanol biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Spektrofotometer UV-Vis	Menghitung kadar (x) dari hasil persamaan regresi	Dinyatakan dalam satuan persen	Ratio

4.7 Teknik Pengumpulan Data

4.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.) akan dilakukan di Politeknik Negeri Jember. Tujuan determinasi untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Diniatik, 2015).

4.7.2 Pengambilan Sampel

Sampel kakao (*Theobroma cacao* L.) diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao di Kabupaten Jember. Sampel yang digunakan yaitu bagian biji dari kakao dan sudah berupa serbuk.

4.7.3 Ekstraksi Sampel

Sampel serbuk biji kakao ditimbang sebanyak 500 gram lalu dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 2,5 liter. Serbuk biji kakao direndam dalam pelarut etanol selama 5 hari dengan pengadukan setiap 24 jam. Setelah 3 hari sampel disaring menggunakan corong Buchner. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm, sedangkan residu yang diperoleh diremaserasi dengan pelarut hasil rotavapor selama 24 jam. Filtrat hasil remaserasi dipekatkan kembali menggunakan rotavapor pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak kental yang diperoleh diambil dan dimasukkan ke dalam vial (Wardani, 2021). Rendemen ekstrak etanol biji kakao yang didapatkan dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100$$

4.7.4 Identifikasi Senyawa Flavonoid

a. Pembuatan Blanko Ekstrak

Ekstrak etanol biji kakao ditimbang sebanyak 1 gram dilarutkan dengan air panas sebanyak 10 mL. Larutan ekstrak etanol disaring kemudian filtrate ditambahkan etanol sampai 10 mL.

b. Uji Shinoda

Larutan ekstrak etanol sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif terdapat senyawa flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah jingga hingga merah (Ergina, 2014).

c. Uji H_2SO_4

Larutan ekstrak etanol sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan H_2SO_4 , diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil positif jika terbentuk warna merah gelap hingga coklat atau kehitaman (Kusnadi & Devi, 2017).

4.7.5 Preparasi Larutan

a. Pembuatan Larutan Baku Standar Kuersetin

Kuersetin sebanyak 25 mg ditimbang dan dilarutkan dalam 25 mL etanol sebagai larutan stok 1000 ppm. Larutan baku standar kuersetin dibuat pengenceran dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 50 mL (Yeti & Yuniarti, 2021).

b. Penentuan Panjang Gelombang

Larutan baku standar kuersetin diambil 4 mL, kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai 10 mL. Diukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Yeti & Yuniarti, 2021).

c. Penentuan *Operating time*

Larutan baku standar kuersetin diambil 4 mL, kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai 10 mL (Yeti & Yuniarti, 2021). Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum sampai diperoleh waktu serapan yang stabil.

Tujuan dari pelaksanaan *operating time* adalah untuk mengetahui waktu pengukuran dari senyawa yang didapatkan ketika absorbansi paling stabil. Pada *operating time* butuh dilakukan untuk meminimalkan sebuah kesalahan dalam pengukuran. Hasil dari penentuan *operating time* ini adalah sebuah tabel dengan waktu dalam satuan menit kemudian akan diperlihatkan pada menit ke berapa akan terjadi kestabilan absorbansi. maka dapat dilaksanakan pengukuran absorbansi pada menit yang stabil tersebut (Suharyanto & Prima, 2020).

d. Penentuan Konsentrasi Optimum

Dibuat seri kadar larutan standar baku dan sampel sebanyak 10 mL dengan konsentrasi standar 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm dan konsentrasi sampel 1600 ppm, 1700 ppm, 1800 ppm, 1900 ppm, dan 2000 ppm. Masing-masing seri kadar dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M,

2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai tanda batas (Yeti & Yuniarti, 2021). Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum.

4.7.6 Validasi Metode Analisis

a. Spesifisitas

Dibuat masing-masing 10 mL ekstrak etanol biji kakao dengan konsentrasi 1800 ppm, campuran ekstrak etanol dan paracetamol dengan konsentrasi 1800 ppm, dan kuersetin dengan konsentrasi 40 ppm. Masing-masing dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai tanda batas (Yeti & Yuniarti, 2021).

b. Linieritas

Dibuat larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 50 mL. Penentuan linieritas dilakukan dengan membuat larutan baku kerja dengan pengenceran seri konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, dan 40 ppm masing-masing 10 mL. Masing-masing seri kadar dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai tanda batas (Yeti & Yuniarti, 2021). Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum. Absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat suatu persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasinya.

c. Akurasi

Akurasi dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku (*Standar addition method*). Uji ini dilakukan untuk memperoleh nilai persen

perolehan kembali dalam penambahan volume larutan uji yang meningkat dalam rentang konsentrasi 30%, 45%, dan 60% dari ekstrak etanol biji kakao dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali tiap konsentrasi. Hasil yang diperoleh kemudian digunakan sebagai perhitungan persen *recovery*.

d. Presisi

Ditimbang ekstrak etanol biji kakao sebanyak 18 mg dan ditambahkan standar kuersetin persentase 30%, 45%, dan 60% dari konsentrasi optimum kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan etanol 96%. Dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai tanda batas (Yeti & Yuniarti, 2021). Dilakukan proses replikasi sebanyak 6 kali lalu diukur serapan absorbansi pada panjang gelombang maksimum.

e. *Limit of Detection* dan *Limit of Quantitation*

Limit of Detection dan *Limit of Quantitation* ditentukan dengan membuat tujuh konsentrasi di bawah konsentrasi terkecil dari linearitas. Dari hasil pengukuran dapat diperoleh nilai b (*slope*) pada persamaan garis linear $y = bx + a$. Dibuat konsentrasi standar kuersetin 100 ppm sebanyak 50 mL. Dilakukan pengenceran bertingkat yaitu 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm masing-masing 10 mL. Dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai tanda batas (Yeti & Yuniarti, 2021).

4.7.7 Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao

Penetapan kadar dilakukan dengan membuat larutan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 1800 ppm ke dalam 10 mL etanol. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai tanda batas (Yeti & Yuniarti, 2021). Kadar flavonoid ditentukan berdasarkan interpolasi absorbansi ke dalam persamaan regresi linier standar kuersetin sehingga didapatkan konsentrasi sampel.

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{\text{konsentrasi } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \text{volume sampel}}{\text{berat sampel}} \times \text{fp}$$

BAB V. HASIL PENELITIAN

5.1 Data Umum Penelitian

5.1.1 Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan di Politeknik Negeri Jember menyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan adalah bagian biji dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dan hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

5.1.2 Ekstraksi Sampel

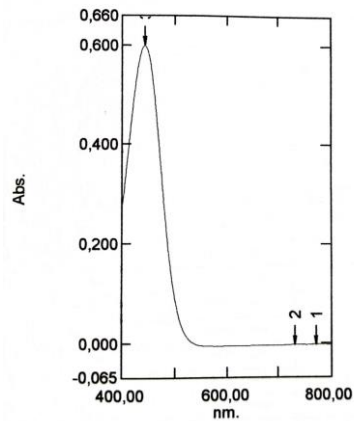
Maserasi biji kakao diperoleh ekstrak kental sebanyak 15,27 gram sehingga diperoleh nilai rendemen hasil ekstraksi maserasi yaitu 3,05%. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 3.

5.1.3 Identifikasi Senyawa Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid dengan uji shinoda menunjukkan perubahan warna dari coklat menjadi merah dan uji dengan H_2SO_4 menunjukkan perubahan warna dari coklat menjadi merah gelap, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada biji kakao terdapat senyawa flavonoid. Hasil identifikasi senyawa flavonoid dapat dilihat pada lampiran 4.

5.1.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada panjang gelombang 400-800 nm dan diperoleh panjang gelombang maksimum pada panjang gelombang 443 nm. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

5.1.5 Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* diperoleh absorbansi yang stabil pada menit ke-15 sampai menit ke-20 dengan absorbansi 0.607 dan 0.608. Hasil penelitian *operating time* dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Penentuan *Operating Time*

Menit	Absorbansi
5	0.603
10	0.605
15	0.607
20	0.608
25	0.610
30	0.612
35	0.614
40	0.616
45	0.618
50	0.620
55	0.622
60	0.624

5.1.6 Penentuan Konsentrasi Optimum

Penentuan konsentrasi optimum didapatkan pada konsentrasi 40 ppm standar kuersetin dan konsentrasi 1800 ppm sampel ekstrak etanol biji kakao dengan persen *recovery* 99%. Hasil penentuan konsentrasi optimum dapat dilihat pada tabel 5.2.

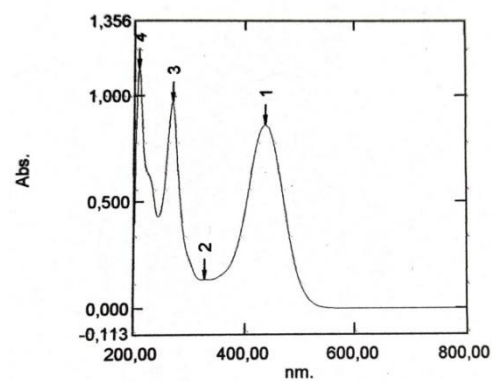
Tabel 5.2 Penentuan Konsentrasi Optimum

Konsentrasi	Absorbansi
standar 10	0.100
standar 20	0.204
standar 40	0.338
standar 60	0.494
standar 80	0.705
sampel 1600	0.229
sampel 1700	0.227
sampel 1800	0.335
sampel 1900	0.381
sampel 2000	0.519

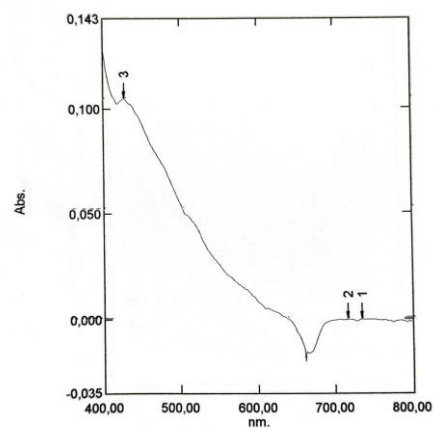
5.2 Data Khusus Penelitian

5.2.1 Spesifisitas

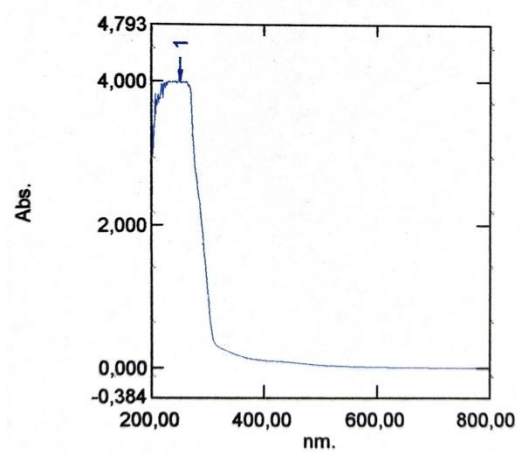
Pengukuran spesifisitas dilakukan dengan cara membandingkan spektra standar kuersetin, sampel ekstrak etanol biji kakao dan campuran sampel dengan analit lain. Didapatkan hasil pengukuran standar kuersetin pada panjang gelombang 437 nm dengan absorbansi 0.862, sampel ekstrak etanol biji kakao pada panjang gelombang 427 nm dengan absorbansi 0.105, dan campuran sampel dengan analit lain pada panjang gelombang 249 nm dengan absorbansi 4.000. Spektra hasil pengukuran dapat dilihat pada gambar 5.2, 5.3, dan 5.4.



Gambar 5.2 Spektra Standar λ 437 nm



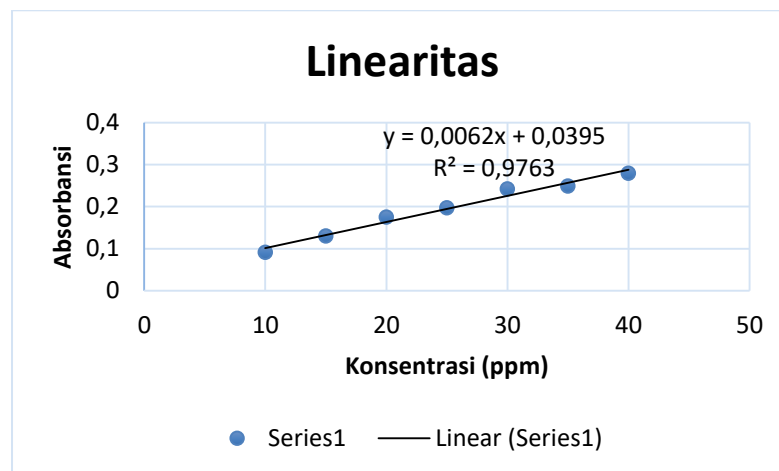
Gambar 5.3 Spektra Sampel λ 427 nm



Gambar 5.4 Spektra Sampel dan Analit Lain λ 249 nm

5.2.2 Linieritas

Uji linieritas menghasilkan persamaan regresi $y = 0,006x + 0,039$ dengan nilai $r = 0,988$ dan $V_{xo} = 1,28$. Kurva linieritas dapat dilihat pada gambar 5.5.



Gambar 5.5 Linieritas

5.2.3 Akurasi

Hasil uji akurasi ditunjukkan dengan nilai persen *recovery*, dimana rentang *recovery* 100 ppm yaitu 90-107% sehingga hasil uji akurasi dikatakan memenuhi persyaratan persen *recovery* jika memenuhi rentang tersebut. Hasil penelitian uji akurasi dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Akurasi

Konsentrasi	Absorbansi	x	$\bar{x}$	% Recovery	$\bar{x}$ % Recovery	SD	%RSD
sampel 30%	0,458	34,077	33,538	103,417	98,928	0,742	2,212
	0,455	33,846		101,492			
	0,440	32,692		91,875			
sampel 45%	0,553	41,385	40,643	109,554	105,427	1,419	3,491
	0,523	39,007		96,333			
	0,555	41,538		110,394			
sampel 60%	0,606	45,466	46,13	99,163	101,928	0,652	1.413
	0,623	46,769		104,592			
	0,615	46,154		102,029			

5.2.4 Presisi

Hasil uji presisi dilakukan pengukuran menggunakan persamaan regresi $y = 0,013x + 0,015$ dengan $r = 0,999$. Penentuan presisi dilakukan replikasi sebanyak 6 kali pada masing-masing konsentrasi yaitu 30%, 45%, dan 60%. Hasil uji presisi ditunjukkan dengan nilai %RSD yang tidak lebih dari 5%. Hasil dari uji presisi dapat dilihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Presisi

Konsentrasi	Absorbansi	X	Rerata	SD	%RSD
sampel 30%	0,458	34,077	33,231	0,876	2,636
	0,455	33,846			
	0,440	32,692			
	0,430	31,923			
	0,442	32,846			
	0,457	34,000			
sampel 45%	0,553	41,385	40,001	1,801	4,502
	0,523	39,007			
	0,555	41,538			
	0,527	41,692			
	0,500	37,308			
	0,523	39,077			
sampel 60%	0,606	45,466	45,603	0,714	1,566
	0,623	46,769			
	0,615	46,154			
	0,600	45,000			
	0,603	45,231			
	0,600	45,000			

5.2.5 Limit of Detection dan Limit of Quantitation

Hasil uji limit deteksi dan limit kuantitasi menghasilkan persamaan regresi yaitu $y = 0,009x + 0,032$ dengan nilai $r = 0,998$ sehingga didapatkan nilai LOD = 8,66 ppm dan LOQ = 28,867 ppm. Hasil penentuan LOD dan LOQ dapat dilihat pada lampiran 8.

5.2.6 Penetapan Kadar

Kadar flavonoid ekstrak etanol biji kakao dihitung dengan memasukkan absorbansi sampel pada persamaan $y = 0,012x + 0,02$, kemudian dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{\text{konsentrasi } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \text{volume sampel}}{\text{berat sampel}} \times \text{fp}$$

Fp merupakan faktor pengenceran dari larutan sampel yang dibuat. Hasil penentuan kadar flavonoid ekstrak etanol biji kakao dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.5 Penetapan Kadar

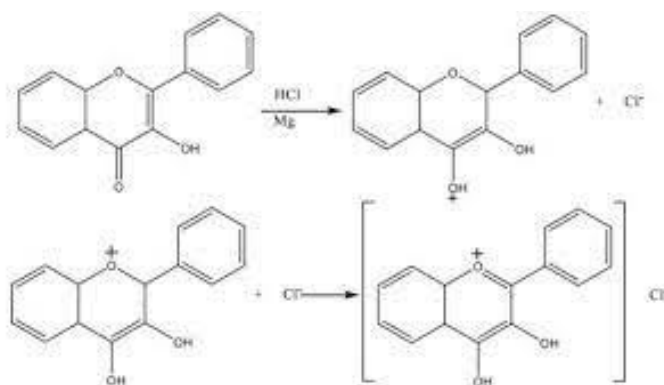
Konsentrasi	Absorbansi	x	Kadar Flavonoid Total	$\bar{x}$ Kadar Flavonoid	SD
Rep 1	0,49	39,167	21,8	21,667	0,482
Rep 2	0,48	38,333	21,4		
Rep 3	0,49	39,167	21,8		
$\bar{x}$ Kadar Flavonoid $\pm$ SD				21,667 $\pm$ 0,482	

BAB VI. PEMBAHASAN

6.1 Identifikasi Senyawa Flavonoid

6.1.1 Uji Shinoda

Pengujian kadar flavonoid total dengan menggunakan pereaksi Shinoda. Dihasilkan perubahan warna larutan menjadi berwarna jingga dikarenakan senyawa kompleks dari ion magnesium dengan ion fenoksi pada senyawa flavonoid. Reduksi senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak dengan Mg^{2+} dan HCl pekat akan membentuk kompleks $[Mg(OAr)_6]^{4-}$ yang berwarna jingga (Marliana, 2012)

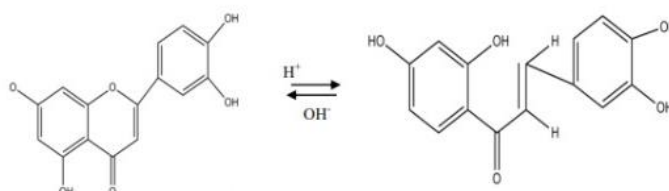


Gambar 6.1 Reaksi Flavonoid Dengan Magnesium
(Setiabudi & Tukiran, 2017)

6.1.2 Uji H_2SO_4

Uji identifikasi yang kedua terjadi perubahan warna yaitu berubah menjadi warna merah tua setelah ditetesi H_2SO_4 . Hal ini membuktikan bahwa ekstrak biji kakao mengandung senyawa flavonoid. Hal ini menunjukkan terjadinya reaksi oksidasi reduksi antara H_2SO_4 dan flavonoid yang menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks yang menimbulkan warna merah tua sampai coklat kehitaman pada sampel (Asih, 2009). Hasil kualitatif reaksi warna pada

rendemen biji kakao diperoleh hasil positif mengandung senyawa flavonoid. Perubahan warna ini terjadi setelah penambahan larutan H_2SO_4 yang memiliki tujuan untuk pembentukan senyawa flavonoid (pembentukan garam flavilium) dengan ditandai warna merah pada larutan sampel. Hal ini menunjukkan adanya reaksi oksidasi reduksi antara H_2SO_4 dan flavonoid yang membentuk senyawa kompleks yang ditandai oleh warna merah sampai coklat kehitaman pada sampel . (Kusnadi & Devi, 2017)



Gambar 6.2 Reaksi Flavonoid Dengan H_2SO_4
(Asih, 2009)

6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum melakukan perhitungan kadar sampel pada spektrofotometer UV-Vis, terlebih dahulu ditentukan panjang gelombang maksimum dengan tujuan agar dapat memberikan kepekaan sampel yang mengandung glimepirid dengan maksimal, bentuk kurva absorbansi linear dan menghasilkan hasil yang cukup konstan jika dilakukan pengukuran berulang. panjang gelombang pengukuran dimana kompleks antara kuersetin dengan AlCl_3 memberikan absorbansi optimum. Penetapan panjang gelombang maksimum merupakan faktor penting dalam analisa kimia dengan metode spektrofotometri. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan absorbansi paling besar untuk setiap satuan kadar, sehingga jika akan dilakukan pengukuran ulang dan

replikasi akan meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada panjang gelombang 400-800 nm dan diperoleh panjang gelombang maksimum pada panjang gelombang 443 nm. Apabila panjang gelombang maksimum berbentuk lurus kurva dengan absorbansi linier maka hukum Lambert-Beer terpenuhi (Gandjar dan Rohman, 2012).

6.3 Penentuan *Operating Time*

Operating Time memiliki tujuan untuk mengetahui waktu pengukuran suatu senyawa yang diperoleh saat absorbansi paling stabil. *Operating time* dilakukan dengan mengukur antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan. Penetapan *operating time* perlu dilakukan untuk meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran. Hal ini disebabkan karena senyawa senyawa yang akan diukur absorbansinya dalam penelitian ini merupakan suatu senyawa kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$. Senyawa kompleks ini membutuhkan waktu agar reaksi yang terbentuk stabil. Bila pengukuran dilakukan sebelum waktu *operating time*, maka terdapat kemungkinan reaksi yang terbentuk belum sempurna. *Operating time* pada penelitian ini ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum dari data yang telah dihasilkan pada penentuan panjang gelombang maksimum yaitu 443 nm. *Operating time* pada penelitian ini ss menghasilkan absorbansi yang stabil pada menit ke-15 sampai menit ke-20 dengan absorbansi 0.607 dan 0.608.

6.4 Penentuan Konsentrasi Optimum

Penentuan Konsentrasi Optimum didapatkan dari hasil mencari panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV

karena peak pada konsentrasi ini menunjukkan hasil yang baik. Penentuan konsentrasi optimal dilakukan berdasarkan nilai signifikansi masing-masing uji. Konsentrasi optimum masing-masing standar digunakan dalam membuat kurva regresi linier dengan nilai absorbansi. Penentuan konsentrasi optimum didapatkan pada konsentrasi 40 ppm standar kuersetin dan konsentrasi 1800 ppm sampel ekstrak etanol biji kakao dengan persen *recovery* 99%.

6.5 Validasi Metode Analisis Secara Spektrofotometri Uv-vis

Tindakan yang digunakan untuk memastikan bahwa metode analisis memenuhi tujuan yang diinginkan yaitu validasi (Suseno, 2021). Menurut United States Pharmacopeia (USP), divalidasi dengan metode analisis dengan akurasi, spesifik, reproduktifitas, dan resistensi dari satu set analit. Proses validasi metode penting sebelum melakukan analisis karena diharapkan dapat memberikan data yang akurat.

Pengukuran kandungan flavonoid ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao L.*) menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 400 hingga 800 nm berdasarkan kelompok antara absorbansi dan panjang gelombang, diperoleh panjang gelombang maksimum pada panjang gelombang 443 nm.

Parameter yang digunakan ada 8, dimana harus dievaluasi menjadi implementasi validasi metode analisis. Parameternya adalah akurasi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, linieritas dan jangkauan, kekasaran dan resistansi (Rohman 2019). Farmakope Amerika Serikat (USP) menyatakan bahwa ini tidak selalu menjadi parameter. Untuk evaluasi, perlu dilakukan uji validasi metode. Metode analisis ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao L.*),

hanya 5 parameter diuji, yaitu selektivitas, akurasi, linearitas, limit dan limit deteksi kuantitas karena kelima parameter sudah mewakili data yang dibutuhkan untuk pengujian verifikasi. Hasil uji verifikasi dengan pengembangan metode analisis ekstrak etanol biji kakao dapat diwakili oleh beberapa parameter.

6.5.1 Spesifisitas

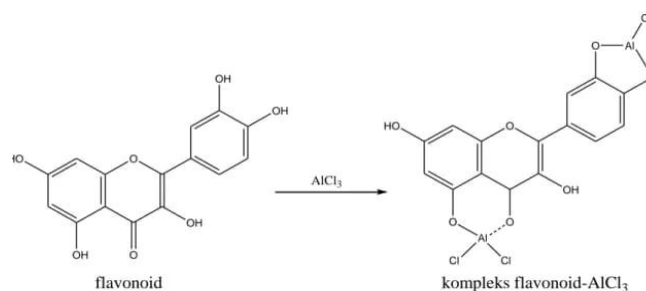
Spesifisitas adalah kemampuan mengukur analit secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi dan komponen matriks (Deovita, 2018).

Kemampuan untuk mengukur suatu objek yang diteliti. Terutama ketika komponen lain hadir dalam matriks sampel: noda, produk dekomposisi, komponen matriks merupakan definisi dari spesifikasi (USP XXXVII, 2014).

Perbandingan spektrum standar kuersetin digunakan untuk mengukur spesifitas, sampel ekstrak etanol biji kakao, dan sampel campuran dengan analit lain. Standar kuersetin dengan panjang gelombang 437 nm dan absorbansi 0,862, sampel ekstrak etanol biji kakao panjang gelombang 427 nm dan absorbansi 0,105, serta hasil pengukuran campuran sampel dengan analit lain panjang gelombang 249 nm dengan absorbansi 4,000. Terjadi pergeseran panjang gelombang antara panjang gelombang maksimum dengan spesifitas yaitu pergeseran hipsokromik merupakan pergeseran absorban ke daerah panjang gelombang yang lebih pendek karena adanya substitusi atau efek pelarut. Kuersetin digunakan sebagai larutan standar karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol

(Azizah dan Faramayuda 2014). Pada penelitian ini menggunakan standar kuersetin karena syarat suatu standar adalah murni atau tunggal hanya mengandung satu jenis senyawa saja serta struktur sama atau mirip dengan senyawa yang diuji. Sampel yang digunakan yaitu biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang mana memiliki kandungan flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang banyak terkandung di dalam biji kakao maka sebab itu penetapan kadar ini memilih flavonoid untuk memfokuskan sebagai senyawa yang akan diteliti dan flavonoid di dalam biji kakao. Sampel campuran dengan analit lain digunakan sebagai pengotor yang mana hasilnya akan dibandingkan dengan sampel ekstrak etanol biji kakao.

Kadar flavonoid dalam ekstrak diukur secara kuantitatif dengan metode alumunium klorida dengan menggunakan larutan standar kuersetin, sehingga hasilnya dihitung sebagai miligram QE (Quercetin Equivalent) per gram dw (dry weight) sampel biji kakao. Kuersetin digunakan sebagai standar karena kuersetin merupakan flavonoid yang mempunyai reaktivitas tinggi dibandingkan rutin, daflon, diosmin dan morin (Mir et. al., 2014). Pada saat pengujian TFC, flavonoid akan bereaksi dengan AlCl_3 dan terbentuk kompleks berwarna kuning. Reaksi antara flavonoid dan AlCl_3 ditampilkan pada Gambar berikut:



Gambar 6.3 Reaksi pembentukan kompleks flavonoid dan AlCl_3
(Fadillah et al., 2017)

Hasil perbandingan beberapa spektra menunjukkan hasil kedekatan antara sampel dengan spektra standar, yaitu pada panjang gelombang antara 427 nm dan 437 nm. Hal ini menunjukkan bahwa sampel mengandung flavonoid sehingga metode analisis memiliki spesifisitas yang baik dalam pengukuran.

6.5.2 Linieritas

Data analisis dari larutan baku pada spektrofotometer yang kemudian diproses dengan metode kuadrat kecil untuk menentukan slope, intercept, dan koefisien korelasinya (Alarfaj *et al.*, 2013; Tietje and Brouder, 2010) digunakan untuk mengukur linieritas.

Kemampuan untuk menguji dan menghasilkan pengujian yang sebanding dengan konsentrasi sampel analit dalam rentang konsentrasi yang dihadapi merupakan pengertian dari linieritas. Untuk mengkonfirmasi hubungan linier antara konsentrasi analit dan respon detektor dalam pengujian menggunakan uji linieritas (Mulyati *et al.*, 2011). Uji linieritas bertujuan untuk mengetahui apakah konsentrasi spektrofotometer pada analit UV-Vis adalah linier atau tidak signifikan (Rohman *et al.*, 2012).

Kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara respon dalam berbagai larutan standar dan konsentrasi yang akan dianalisis merupakan konfirmasi yang dibuat untuk linieritas. Regresi linier dalam bentuk persamaan dapat diidentifikasi dari kurva kalibrasi ini. $y = bx + a$ di mana x adalah konsentrasi, y adalah respons, a adalah perpotongan y yang sebenarnya, dan b adalah gradien yang sebenarnya. Tujuan dari regresi ini adalah untuk menemukan estimasi terbaik dari gradien dan memotong kesalahan residual y . Artinya,

mengurangi perbedaan antara nilai eksperimen yang diprediksi oleh persamaan regresi linier (Harvey, 2000). Koefisien korelasi r dalam analisis regresi linier digunakan sebagai parameter adanya hubungan linier. Hubungan linier yang ideal tercapai ketika nilai b adalah 0 dan r adalah +1 atau -1 tergantung pada arah garis (Harmita, 2004).

Pada uji linieritas mendapatkan persamaan regresi $y = 0,006x + 0,039$ dengan nilai $r = 0,988$ dan $V_{xo} = 1,28$. Larutan standar kuersetin linier dalam rentang konsentrasi 0-200 ppm. Hasil survei ini sejalan dengan survei tahun 2020 oleh Ugo Bussy dkk dengan dengan nilai sama dengan atau lebih besar dari 0,99. Hasil yang baik untuk analisis menggunakan spektrofotometri UV dihasilkan dalam penelitian tersebut. (Bussy et al., 2020).

6.5.3 Akurasi

Akurasi adalah keakuratan metode analisis atau seberapa dekat nilai yang diukur dengan nilai yang diterima, yang dapat berupa nilai yang disepakati, nilai aktual, atau nilai referensi. Akurasi diukur sebagai jumlah analit yang diperoleh kembali dalam pengukuran oleh sampel berduri. Dari perbandingan pengukuran dengan bahan acuan standar maka akan mendapatkan akurasi untuk senyawa obat uji (SRM) (Harmita, 2004: 247). Untuk mendapatkan persen perolehan kembali atau persen perolehan kembali analit dalam matriks dan sampel maka diperlukan uji akurasi. Penambahan standar, yaitu larutan standar dan sampel dengan tiga konsentrasi yang berbeda masing-masing dianalisa 80%, 100% dan 120%. Setiap konsentrasi diulang sebanyak 3 kali merupakan metode akurasi yang digunakan (Indrayanto, 2005).

Metode tiruan (*spike placebo recovery*) atau metode penambahan standar (*standard adition method*). Metode dalam simulasi, analit murni (senyawa referensi kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke campuran dari pembawa obat (plasebo), dan campuran dianalisis dan hasilnya ditampilkan merupakan dua kemungkinan yang digunakan untuk menentukan akurasi. Membandingkan hasil yang diperoleh dengan konsentrasi analit yang ditambahkan (nilai sebenarnya).

Analisis sampel dilakukan dengan menambahkan standar dan kemudian diuji untuk jumlah analit tertentu. Bersama dengan sampel, campur dan analisis ulang. Lalu membandingkan nilai aktual (hasil yang diharapkan) dari dan . Dalam kedua metode, pemulihan dinyatakan sebagai hasil, yang sama dengan sebenarnya hasil yang diinginkan . (Hammita, 2004).

Recovery, dan rentang recovery ICH dalam rentang 100 ppm adalah 90-107% merupakan hasil dari uji akurasi, sehingga hasil uji akurasi untuk penelitian ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan recovery. Hasil survei ini sejalan dengan survei tahun 2020 yang dilakukan oleh Ugo Bussy dkk, dengan nilai berkisar antara 90,9% hingga 125,4%. Untuk memberikan hasil yang akurat, penelitian ini menganalisis penentuan konsentrasi ekstrak etanol pada biji kakao secara spektrofotometri. (Bussy et al., 2020)

6.5.4 Presisi

Uji presisi yang dilakukan termasuk dalam kategori keterulangan. Pengujian dilakukan untuk menyiapkan rangkaian larutan standar kafein dengan rentang konsentrasi antara 80% - 120% dari konsentrasi pengujian, diulang sebanyak 6 kali. Menurut ICH, presisi harus dilakukan pada 3 level yang berbeda, yaitu:

repeatability, intermediate precision dan reproduktifitas. Parameter yang digunakan untuk penujian presisi yaitu dua parameter: pengulangan dan presisi menengah. Reproduksiabilitas sering dilakukan ketika membandingkan tes antar laboratorium (Rohman, 2007:465). Parameter RSD (deviasi standar relatif) untuk menentukan uji presisi.

Reproduktifitas (reproduktifitas), akurasi sedang dan reproduktifitas (reproduktifitas) digunakan untuk penentuan presisi. Reproduksiabilitas didefinisikan sebagai penggunaan dan pengoperasian laboratorium dan peralatan yang sama oleh analis pada hari yang sama. Akurasi sedang adalah akurasi dalam kondisi eksperimental. Gunakan analisis, instrumen, reagen, dan kolom yang berbeda di laboratorium yang sama. Keakuratan hasil yang dapat dilakukan di lapangan ditunjukkan oleh reproduksiabilitas. Eksperimen lain untuk melihat apakah pendekatan ini berhasil untuk fasilitas lapangan yang berbeda (dengan Yuwono, Indrayant, 2005).

Persamaan regresi $y = 0,013x + 0,015$, $r = 0,999$ digunakan untuk pengukuran hasil presisi. Pengulangan untuk menentukan presisi sebanyak 6 kali pada masing-masing konsentrasi, yaitu 30%, 45%, dan 60%. Nilai $RSD \leq 5\%$ menunjukkan nilai uji presisi. Hasil uji presisi penelitian ini memenuhi persyaratan nilai % RSD. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian tahun 2020 yang dilakukan oleh Ugo Bussy dkk, dengan nilai % RSD sebesar $< 10\%$ pada konsentrasi yang lebih rendah. Penggunaan spektrofotometri masih diterima dengan baik meskipun dilakukan pengulangan ditunjukkan oleh penelitian ini. (Bussy et al., 2020)

6.5.5 *Limit of Detection dan Limit of Quantitation*

Batas deteksi dan kuantifikasi dapat dihitung secara statistik dengan menyiapkan solusi standar kerja dari garis regresi linier kurva kalibrasi. Panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur absorbansi larutan kontrol. Setelah mengukur absorbansi larutan standar kerja, cari persamaan regresi antara konsentrasi (konsentrasi) dan absorbansi. Standar deviasi (SD) dari respon dan kemiringan (S) dari kurva standar sesuai dengan rumus: $LOQ = 10 (SD/S)$ Standar deviasi dari respon dapat didasarkan pada standar deviasi dari kosong versus standar deviasi dari residual dari garis regresi linier atau dengan Standar deviasi dari intersep garis regresi - y. LOD juga dapat dihitung dari standar deviasi (SD) dari respon kemiringan (Slope,S) dari kurva standar pada tingkat yang dekat dengan LOD sesuai dengan rumus $LOD = 3,3 (SD/S)$ digunakan untuk menghitung harga batas dekteksi dan batas kuantifikasi. Standar deviasi respon dapat ditentukan dari standar deviasi blanko, standar deviasi residual pada garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi (Harmita, 2004:269). Untuk memperoleh nilai LOD dan LOQ maka dilakukan persamaan kurva kalibrasi, dan nilai LOD dan LOQ diperoleh dari nilai kemiringan. LOD ditentukan untuk menentukan jumlah analit atau jumlah sampel terkecil dalam sampel yang masih menghasilkan respon yang signifikan terhadap metode tersebut.

Konsentrasi analit terendah yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi merupakan limit deteksi. Sedangkan untuk menentukan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi

dan akurasi pada kondisi analisis yang digunakan merupakan batas kuantifikasi (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

Hasil deteksi dan uji limit menghasilkan $y = 0,009x + 0,032$ dengan persamaan regresi yaitu nilai $r = 0,998$ dengan nilai $LOD = 8,66$ dan $LOQ = 28,867$. Nilai SD yang didapat adalah 1,3696, sehingga batas deteksi dan kuantifikasinya adalah 8,66ppm dan 28,867ppm. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Ugo Bussy dkk pada tahun 2020 memiliki hasil 0,05 yang mana hasilnya tidak tercapai dengan persyaratan nilai 0,05-500 dikarenakan tidak ada basis kakao di sushu rendah. (Bussy et al., 2020).

6.6 Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao

Data yang diperoleh merupakan data mentah yang diperoleh dari absorbansi larutan pembanding kafein, dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linier. Konsentrasi total senyawa disubstitusikan ke dalam persamaan regresi linier $y=bx+a$, diperoleh dengan membandingkan kurva kalibrasi, dan hasilnya dinyatakan dalam %b/b. Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk analisis Kuantitatif Flavonoid Total Flavonoid total dalam ekstrak etanol biji kakao (*Persea americana* Mill). Analisis flavonoid dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, karena flavonoid mengandung sistem aromatik terkonjugasi dan oleh karena itu menunjukkan pita serapan yang kuat di daerah spektral UV dan sinar tampak (Harborne, J.B 1987).

Analisis kuantitatif kadar senyawa flavonoid total dilakukan dengan menggunakan metode pereaksi $AlCl_3$ menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dan kadarnya dinyatakan dalam % quercetin ekivalen (QE). Kuersetin digunakan

untuk standar dalam menentukan kandungan flavonoid didapatkan dari senyawa tersebut. Atom C-4, C-3 dan C-5 yang berdekatan memiliki gugus hidroksil (Dyah et al., 2014).

TFC (*Total Flavonoid Content*) didefinisikan dalam miligram dan setara dengan miligram kuersetin per gram. Berat kering (mg QE / g dw). Kuersetin merupakan senyawa flavonoid yang tersebar luas di alam. Nama kuersetin telah digunakan sejak tahun 1857 dan berasal dari kata kuersetin (Hutan Oak). Penghambat transpor auksin polar yang terjadi secara alami. Flavonoid termasuk dalam kelompok senyawa yang terdapat pada tumbuhan sebagai bahan obat disebut dengan flavonoid. Contoh dari golongan flavonoid adalah kuersetin yang berperan sebagai agen antitumor.

Cara untuk menghitung kandungan flavonoid ekstrak etanol biji kakao yaitu mensubstitusikan absorpsi sampel kedalam persamaan $y = 0,012x + 0,02$. Setelah melakukan tiga kali, penelitian ini menghasilkan kandungan flavonoid total rata-rat sebesar 21,667 mg/QE/g. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian dari Dyah Nur Azizah tahun 2014, Kadar flavonoid golongan flavon dan flavonol pada ekstrak metanol kulit buah kakao adalah sebesar $0,2371 \pm 0,0004$ %. (Azizah et al., 2014)

BAB VII. PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol biji kakao mengandung senyawa kimia flavonoid
2. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 443 nm. Diperoleh serapan paling stabil pada menit ke-15 dan ke-20 dengan besar absorbansi 0,607 dan 0,608. Konsentrasi optimum standar kuersetin yaitu pada konsentrasi 40 ppm dan sampel ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 1800 ppm. Validasi metode analisis memiliki validitas yang baik yang memenuhi parameter spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, dan *limit of detection* dan *limit of quantitation*
3. Hasil uji penetapan kadar flavonoid menunjukkan ekstrak etanol biji kakao sebesar 21,667 mg/QE/g ekstrak.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji aktivitas ekstrak etanol biji kakao
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji aktioksidan ekstrak etanol biji kakao dengan metode lain
3. Perlu dilakukan validasi metode analisis dan penetapan kadar flavonoid ekstrak etanol biji kakao menggunakan metode lain
4. Perlu dilakukan validasi metode analisis dan penetapan kadar senyawa kimia lain pada ekstrak etanol biji kakao.

DAFTAR PUSTAKA

- A. Guntero, V., M. Mancini, P., & N. Kneeteman, M. (2017). Introducing Organic Chemistry Students to the Extraction of Natural Products Found in Vegetal Species. *World Journal of Chemical Education*, 5(4), 142–147. <https://doi.org/10.12691/wjce-5-4-5>
- Alfaridz, F., & Amalia, R. (2015). Review Jurnal: Klasifikasi Dan Aktivitas Farmakologi Dari Senyawa Aktif Flavonoid. *Farmaka Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat*, 16(3), 1–9.
- Alwi, H. (2017). *VALIDASI METODE ANALISIS FLAVONOID DARI EKSTRAK ETANOL KASUMBA TURATE (Carthamus tinctorius L.) SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS*.
- Andini, D., Mulangsri, K., Budiarti, A., & Saputri, E. N. (2017). Aktivitas Antioksidan Fraksi Dietileter Buah Mangga Arumanis (*Mangifera indica* L .) dengan Metode DPPH. *Jurnal Pharmascience*, 04(01), 85–93.
- Anwar, H. U., Andarwulan, N., & Yuliana, N. D. (2017). Identifikasi Komponen Antibakteri Pada Ekstrak Buah Takokak Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Mutu Pangan*, 4(2), 59–64.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29. <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). PENETAPAN KADAR FLAVONOID METODE $AlCl_3$ PADA EKSTRAK METANOL KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah*

Farmasi, 2(2), 45–49. <https://doi.org/10.26874/kjif.v2i2.14>

Budari, M. K. S., Dewantara, I. N. A., & Wijayanti, N. P. A. D. (2015). Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar α -Mangostin Pada Gel Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Dengan KLT-Spektrofotodensitometri. *Jurnal Farmasi Udayana*, 4(2), 20–24.

Chairunnisa, S., Wartini, N. M., & Suhendra, L. (2019). Pengaruh Suhu dan Waktu Maserasi terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) sebagai Sumber Saponin. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 7(4), 551. <https://doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i04.p07>

Deovita, G. E. (2018). Validasi Metode Analisis Daidzein Dalam Wound Healing Patch Secara Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. In *Universitas Sanata Dharma Yogyakarta* (Vol. 151, Issue 2).

Dewi, N. W. R. K., Gunawan, I. W., & Puspawati, N. M. (2017). GOLONGAN FLAVONOID DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN PRANAJIWA (*Euchresta horsfieldii* Lesch Benn.). *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*, 5(1), 26–34.

Ergina, Nuryanti, S., & Pursitasari, I. D. (2014). UJI KUALITATIF SENYAWA METABOLIT SEKUNDER PADA DAUN PALADO (*Agave angustifolia*) YANG DIEKSTRAKSI DENGAN PELARUT AIR DAN ETANOL. *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3), 165–172.

Erwiyani, A. R., Gultom, D. S. R., & Oktianti, D. (2021). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Menggunakan Metode $AlCl_3$. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*,

04(01), 1–7.

Felicia, M., Tanudjaja, B. B., & Salamoon, D. K. (2016). Perancangan Media Komunikasi Visual Produk Cokelat Vicco Kopkar Sekar Jember. *Program Studi Desain Komunikasi Visual, Universitas Kristen Petra*, 1–10.

Hafidhah, N., Hakim, R. F., & Fakhrurrazi. (2017). Pengaruh Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* pada Berbagai Konsentrasi. *Journal Caninus Denstistry*, 2(2), 92–96.

Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117–135.

Harmono, H. D. (2020). Validasi Metode Analisis Logam Merkuri (Hg) Terlarutn pada Air Permukaan dengan Automatic Mercury Analyzer. *Indonesian Journal of Laboratory*, 2(3), 11–16. <https://doi.org/10.22146/ijl.v2i3.57047>

Hasanah, M., Tasriyanti, F., & Darwis, D. (2015). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Benalu Sawo (*Helixanthere* SP) Hasil Ekstraksi Soxhletasi dan Perkolasi. *Prosiding SNaPP*, 1(1), 189–194.

Hasrianti, Nururrahmah, & Nurasia. (2016). Pemanfaatan Ekstrak Bawang Merah dan Asam Asetat Sebagai Pengawet Alami. *Dinamika*, 07(1), 9–30.

Hidayat, N., Yati, K., Krisanti, E. A., & Gozan, M. (2019). Extraction and Antioxidant Activity Test of Black Sumatran Incense. *AIP Conference Proceedings*, 2193(December). <https://doi.org/10.1063/1.5139354>

Humadi, D. . S. S. ., & Obaid, D. . A. K. (2020). Pharmacognosy Laboratory Manual First Semester. *Department Of Pharmacy Department Of Pharmacognosy, January 2019*.

- Husna, A., Suherman, & Nuryanti, S. (2017). Pembuatan Tepung dari Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) dan Uji Kualitasnya. *Jurnal Akademika Kimia*, 6(2), 132. <https://doi.org/10.22487/j24775185.2017.v6.i2.9245>
- Ipandi, I., Triyasmono, L., & Prayitno, B. (2016). Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kajajahi (*Leucosyke capitellata* Wedd.). *Scientia : Jurnal Farmasi Dan Kesehatan*, 5(1), 8.
- Julianto, T. S. (2019). Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <http://library.uui.ac.id>; e-mail: perpustakaan@uui.ac.id
- Karim, S. F. (2014). *Uji Aktivitas Infusa Daun Srikaya (Annona squamosa L.) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Dalam Darah Mencit (Mus musculus)*. UNIVERSITAS ISLAM NEGERI ALAUDDIN.
- Kayaputri, I. L., Sumanti, D. M., Djali, M., Indarto, R., & Dewi, D. L. (2012). *Kajian Fitokimia EKstrak KULit Biji Kakao (Theobroma cacao L .)*. 83–90.
- Khafidhoh, Z., Dewi, S. S., & Iswara, A. (2015). Efektivitas Infusa Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC.) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Penyebab Sariawan Secara In Vitro. *The 2nd University Research Coloquium 2015*, 31–37.
- Leonardy, C., Nurmainah, & Riza, H. (2019). Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Infusa Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* (L .) Merr .) pada Variasi Usia Kematangan Buah. *Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Indonesia*, 1–15.
- Luqyana, L., & Husni, P. (2019). Aktivitas Farmakologi Tanaman Mangga

- (*Mangifera indica* L.): Review. *Farmaka, Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran*, 17(2), 187–194.
- Martono, B. (2014). Karakteristik Morfologi Dan Kegiatan Plasma Nutfah Tanaman Kakao. *Inovasi Teknologi Bioindustri Kakao*, 15–27.
- Mukhriani. (2014). Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar*, 7(2), 361–367.
- Mukhriani, M., Rusdi, M., Arsul, M. I., Sugiarna, R., & Farhan, N. (2019). Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Anggur (*Vitis vinifera* L). *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2).
<https://doi.org/10.24252/djps.v2i2.11503>
- Mulyati, A. H., Sutanto, & Apriyani, D. (2011). Validasi metode analisis kadar Ambroksol Hidroklorida dalam sediaan tablet cystelis secara kromatografi cair kinerja tinggi. *Ekologia*, 11(2), 36–45.
- Puspitasari, A. D., & Proyogo, L. S. (2013). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 1–8.
- Putra, A. A. B., Bogoriani, N. W., Diantariani, N. P., & Sumadewi, N. L. U. (2014). Ekstraksi Zat Warna Alam Dari Bonggol Tanaman Pisang (*Musa paradisiaca* L.) Dengan Metode Maserasi, Refluks dan Sokletasi. *Journal of Chemistry*, 8(1), 113–119.
- Rahayu, W. S., Utami, P. I., & Fajar, S. I. (2009). Penetapan Kadar Tablet Ranitidin Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis dengan Pelarut

- Metanol. *Pharmacy*, 06(03), 104–125.
- Ranneh, Y., Ali, F., & Esa, N. M. (2013). The Protective Effect of Cocoa (Theobroma cacao L.) in Colon Cancer. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 03(02), 2–4. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000193>
- Retnani, N. I. D., Utami, P. I., & Setiawan, Di. (2010). Analisis Kuantitatif Tablet Levofloksasin Merk dan Generik Dalam Plasma Manusia Secara In Vitro Dengan Metode Spektrofotometri Ultraviolet-Visible. *Journal Pharmacy*, 07(01), 119–127.
- Rohmah, S. A. A., Muadifah, A., & Martha, R.D. (2021). Validasi Metode Penetapan Kadar Pengawet Natrium Benzoat pada Sari Kedelai di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Tulungagung Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(2), 120–127.
- Santosa, I., & Sulistiawati, E. (2014). Ekstraksi Abu Kayu Dengan Pelarut Air Menggunakan Sistem Bertahap Banyak Beraliran Silang. *Program Studi Teknik Kimia Universitas Ahmad Dahlan*, 1, 33–39.
- Sepriyani, R. (2020). Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (Theobroma cacao L .) Sebagai Antimikroba Terhadap Streptococcus mutans.
- Sugihartini, N., Fudholi, A., Pramono, S., & Sismindari, S. (2014). Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigallocatekin Galat Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Pharmaciana*, 4(2). <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v4i2.1567>
- Suhartati, T. (2017). *Dasar-dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa organik* (Edisi pert).

- Suharyanto, & Prima, D. A. N. (2020). Penetapan Kadar Flavonoid Total pada Juice Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas* L.) yang Berpotensi Sebagai Hepatoprotektor dengan Metode Spektrofotometri *Cendekia Journal of Pharmacy*, 4(2), 110–119.
<http://cjp.jurnal.stikescendekiautamakudus.ac.id/index.php/cjp/article/view/89>
- Sumarno, D., & Kusumaningtyas, D. I. (2018). PENENTUAN LIMIT DETEKSI DAN LIMIT KUANTITASI UNTUK ANALISIS LOGAM TIMBAL (Pb) DALAM AIR TAWAR MENGGUNAKAN ALAT SPEKTROFOTOMETER SERAPAN ATOM. *Buletin Teknik Litkayasa*, 16(1), 1–5.
- Susanty, S., & Bachmid, F. (2016). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Konversi*, 5(2), 87. <https://doi.org/10.24853/konversi.5.2.87-92>
- Sutrisna, E., Wahyuni, A. S., & Setiani, L. A. (2010). Efek Infusa Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Sceff.) Boerl.) terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Darah Mencit Putih Jantan Yang Diinduksi Dengan Potassium Oxonate. *Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta*, 11(1), 19–24.
- Suyono, S., & Carnovia, C. (2018). Sistem Pendukung Keputusan Menentukan Penyakit Pada Tanaman Kakao Menggunakan Metode Topsis. *Explore: Jurnal Sistem Informasi Dan Telematika*, 9(1), 78–87.
<https://doi.org/10.36448/jsit.v9i1.1034>

- Syamsul, E. S., Amanda, N. A., & Lestari, D. (2020). Perbandingan Ekstrak Lamur *Aquilaria malaccensis* Dengan Metode Maserasi Dan Refluks. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 2(2), 97–104. <https://doi.org/10.33759/jrki.v2i2.85>
- Sylvia, D., Gantina, A., & Rusdiana, N. (2018). Analisis Sibutramin Hidro klorida Pada Jamu Pelangsing di Kecamatan Curug Dengan Spektrofotometri UV. *Farmagazine*, 5(2), 1–5.
- Tetha E.S, D. A., & Sugiarto K. S, R. D. (2016). Pebandingan Metode Analisa Kadar Besi antara Serimetri dan Spektrofotometer UV-Vis dengan Pengompleks 1,10- Fenantrolin. *Akta Kimia Indonesia*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.12962/j25493736.v1i1.1419>
- Towaha, J. (2014). Kandungan Senyawa Polifenol Pada Biji Kakao Dan Kontribusinya Terhadap Kesehatan. *Sirinov*, 2(no 1), 1–16. <http://balittri.litbang.pertanian.go.id/index.php/publikasi/category/63-sirinov-vol2-no-1?download=160%3Asirinov-vol2-no-1-01>
- Tunnisa, T., Mursiti, S., & Jumaeri. (2018). Isolasi Flavonoid Kulit Buah Durian dan Uji Aktivitasnya sebagai Antirayap *Coptotermes* sp. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 7(1), 21–27.
- Wahyulianingsih, Handayani, S., & Malik, A. (2016). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 3(2), 188–193. <https://doi.org/10.33096/jffi.v3i2.221>
- Wardani, A. D. (2021). *Validasi Metode dan Penentuan Kadar Alkaloid Total*

- Fraksi Etil Astat Daun Sirsak (Annina muricata L.) Secara Spektrofotometri UV-Vis Di Desa Kemiri Kabupaten Jember. Universitas dr.Soebandi.*
- Widiyanto, A. (2007). *Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Fraksi Eter Perasan Daging Buah Makuta Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.)*.
- Wisudyaningsih, B. (2015). Studi preformulasi: validasi metode spektrofotometri ofloksasin dalam larutan dapar fosfat. *Jurnal Kedokteran Gigi*, 77–81.
- Yanlinastuti, & Fatimah, S. (2016). Pengaruh Konsentrasi Pelarut Untuk Menentukan Kadar Zirkonium dalam Paduan U-Zr dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *PIN Pengelolaan Instalasi Nuklir*, 9(17), 22–33.
- Yeti, A., & Yuniarti, R. (2021). PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL HERBA RUMPUT BAMBU (*Lopatherum gracile* Brongn.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI VISIBLE. *FARMASAINKES: Jurnal Farmasi, Sains, Dan Kesehatan*, 1(1), 11–19.
- Zain, S., Herwanto, T., & Putri, S. (2016). Aktivitas Antioksidan Pada Minyak Biji Kelor (*Moringa Oleifera* L.) Dengan Metode Sokletasi Menggunakan Pelarut N-Heksan, Metanol Dan Etanol. *Jurnal Teknotan*, 10(2), 16–21.
<https://doi.org/10.24198/jt.vol10n2.3>

Lampiran 1. Surat Hasil Determinasi Tanaman

	KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI POLITEKNIK NEGERI JEMBER UPT. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531 E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : http://www.Polije.ac.id
---	---

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 018/PL17.8/PG/2022

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 290/FIKES.UDS/U/I/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Jefrica Maulidah Pratiwisari S P
NIM : 18040048
Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 27 Januari 2022
Ka UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu



Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM
NIP. 197106212001121001

Lampiran 2. Certificate of Analysis Quercetin

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

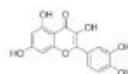
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

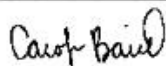
Certificate of Analysis

Product Name:
Quercetin - $\geq 95\%$ (HPLC), solid

Product Number: Q4951
Batch Number: SLCC9071
Brand: SIGMA
CAS Number: 117-39-5
Formula: C₁₅H₁₀O₇
Formula Weight: 302.24 g/mol
Quality Release Date: 25 JUN 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Color) Yellow	Conforms	Conforms
Appearance (Form)	Powder	Powder
¹ H NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Loss on Drying	$\leq 4\%$	1 %
Purity (HPLC)	$\geq 95\%$	99 %



Carolyn Baird, Supervisor
Quality Assurance
St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

Lampiran 3. Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kakao

A. Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kakao

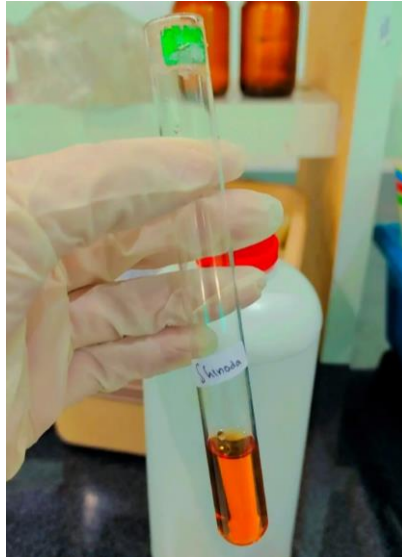
Berat serbuk simplisia : 500 gram

Volume pelarut : 2,5 L

Berat ekstrak etanol : 15,27 gram

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100 \\ &= \frac{15,27 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \\ &= 3.054 \%\end{aligned}$$

Lampiran 4. Identifikasi Senyawa Flavonoid



Lampiran 5. Pembuatan Pereaksi AlCl_3 dan CH_3COONa

A. Pembuatan AlCl_3 10%

10 gram AlCl_3 dalam 100 mL

B. Pembuatan CH_3COONa 1M

$$M = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{\text{mL}}$$

$$1 = \frac{\text{gram}}{82} \times \frac{1000}{50}$$

$$\text{gram} = 4.1$$

Lampiran 6. Perhitungan Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

A. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000$$

$$\text{ppm} = \frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000$$

$$= 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

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

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

$$= 5 \text{ mL}$$

Lampiran 7. Perhitungan Penentuan Konsentrasi Optimum

A. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000$$

$$\begin{aligned} 100 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{50 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 5 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

- $10 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 1$$

- $20 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 2$$

- $40 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 40 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 4$$

- $60 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 60 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 6$$

- $80 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 80 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 8$$

B. Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Etanol Biji Kakao

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000$$

$$\begin{aligned} 2500 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{50 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 125 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

- $1600 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 2500 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 1600 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 6,4$$

- 1700 ppm $\rightarrow$ mL x 2000 ppm = 10 mL x 1700 ppm

$$\text{mL} = 6,8$$

- 1800 ppm $\rightarrow$ mL x 2500 ppm = 10 mL x 1800 ppm

$$\text{mL} = 7,2$$

- 1900 ppm $\rightarrow$ mL x 2500 ppm = 10 mL x 1900 ppm

$$\text{mL} = 7,6$$

- 2000 ppm $\rightarrow$ mL x 2500 ppm = 10 mL x 2000 ppm

$$\text{mL} = 8$$

C. Perhitungan Persen *Recovery* Konsentrasi Optimum

$$\text{konsentrasi hasil} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{konsentrasi hasil}}{\text{konsentrasi teoritis}} \times 100$$

- 10 ppm

$$\begin{aligned} \text{konsentrasi hasil} &= \frac{0.229}{0.1} \times 10 \text{ ppm} \\ &= 22.9 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{22.9}{10} \times 100 \\ &= 229 \% \end{aligned}$$

- 20 ppm

$$\begin{aligned} \text{konsentrasi hasil} &= \frac{0.227}{0.204} \times 20 \text{ ppm} \\ &= 22.2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ recovery} &= \frac{22.2}{20} \times 100 \\ &= 111 \%\end{aligned}$$

- 40 ppm

$$\begin{aligned}\text{konsentrasi hasil} &= \frac{0.335}{0.338} \times 40 \text{ ppm} \\ &= 39.6\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ recovery} &= \frac{39.6}{40} \times 100 \\ &= 99 \%\end{aligned}$$

- 60 ppm

$$\begin{aligned}\text{konsentrasi hasil} &= \frac{0.381}{0.494} \times 60 \text{ ppm} \\ &= 46.3\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ recovery} &= \frac{46.3}{60} \times 100 \\ &= 77.2 \%\end{aligned}$$

- 80 ppm

$$\begin{aligned}\text{konsentrasi hasil} &= \frac{0.519}{0.705} \times 80 \text{ ppm} \\ &= 58.9\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ recovery} &= \frac{58.9}{80} \times 100 \\ &= 73.6 \%\end{aligned}$$

Lampiran 8. Perhitungan Validasi Metode Analisis

A. Spesifisitas

- Ekstrak etanol 1800 ppm

$$\begin{aligned} 1800 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 18 \text{ mg} \end{aligned}$$

- paracetamol 1800 ppm

$$\begin{aligned} 1800 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 18 \text{ mg} \end{aligned}$$

- standar kuersetin 40 ppm

$$\begin{aligned} 40 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 0.4 \text{ mg} \end{aligned}$$

B. Linieritas

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000$$

$$\begin{aligned} 100 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 2,5 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

- $10 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 1$$

- $15 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 15 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 1,5$$

- $20 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 2$$

- $25 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 2,5$$

- $30 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 30 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 3$$

- $35 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 35 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 3,5$$

- $40 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 40 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 4$$

C. Akurasi & Presisi

Sampel ekstrak etanol biji kakao :

$$\begin{aligned} 1800 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 18 \text{ mg} \end{aligned}$$

Baku standar kuersetin :

$$\begin{aligned} 40 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{100 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 4 \text{ mg} \end{aligned}$$

- Adisi 30%

Penambahan baku standar kuersetin :

$$\begin{aligned} 30\% \text{ dari } 40 \text{ ppm} &= \frac{30}{100} \times 40 \text{ ppm} \\ &= 12 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\text{mL} \times 40 \text{ ppm} = 10 \times 12 \text{ ppm}$$

$$\text{mL} = 3$$

- Adisi 45%

Penambahan baku standar kuersetin :

$$\begin{aligned} 45\% \text{ dari } 40 \text{ ppm} &= \frac{45}{100} \times 40 \text{ ppm} \\ &= 18 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\text{mL} \times 40 \text{ ppm} = 10 \times 18 \text{ ppm}$$

$$\text{mL} = 4,5$$

- Adisi 60%

Penambahan baku standar kuersetin :

$$\begin{aligned} 60\% \text{ dari } 40 \text{ ppm} &= \frac{60}{100} \times 40 \text{ ppm} \\ &= 24 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\text{mL} \times 40 \text{ ppm} = 10 \times 24 \text{ ppm}$$

$$\text{mL} = 6$$

a. Perhitungan Akurasi

persamaan regresi $\rightarrow y = bx + a$

$$y = 0,013x + 0,015$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_f - C_a}{C^*a} \times 100$$

C_f = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_a = konsentrasi sampel sebenarnya

C^*a = konsentrasi analit yang ditambahkan

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100$$

- Adisi 30%

$$\text{Replikasi 1 : } 0,458 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 34,077$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{34,077 - 21,667}{12} \times 100$$

$$= 103,417$$

$$\text{Replikasi 2 : } 0,455 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 33,846$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{33,846 - 21,667}{12} \times 100$$

$$= 101,492$$

$$\text{Replikasi 3 : } 0,440 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 32,692$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{32,692 - 21,667}{12} \times 100$$

$$= 91,875$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{0,742}{33,538} \times 100$$

$$= 2,212$$

- Adisi 45%

$$\text{Replikasi 1 : } 0,553 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 41,385$$

$$\% recovery = \frac{41,385 - 21,667}{18} \times 100$$

$$= 109,554$$

$$\text{Replikasi 2 : } 0,523 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 39,007$$

$$\% recovery = \frac{39,007 - 21,667}{18} \times 100$$

$$= 96,333$$

$$\text{Replikasi 3 : } 0,555 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 41,538$$

$$\% recovery = \frac{41,538 - 21,667}{18} \times 100$$

$$= 110,394$$

$$\% RSD = \frac{1,419}{40,643} \times 100$$

$$= 3,491$$

- Adisi 60%

$$\text{Replikasi 1 : } 0,606 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 45,466$$

$$\% recovery = \frac{45,466 - 21,667}{24} \times 100$$

$$= 99,163$$

$$\text{Replikasi 2 : } 0,623 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 46,769$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{46,769 - 21,667}{24} \times 100$$

$$= 104,592$$

$$\text{Replikasi 3 : } 0,615 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 46,154$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{46,154 - 21,667}{24} \times 100$$

$$= 102,029$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{0,652}{46,130} \times 100$$

$$= 1,413$$

b. Perhitungan Presisi

persamaan regresi $\rightarrow y = bx + a$

$$y = 0,013x + 0,015$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

- Adisi 30%

$$\text{Replikasi 1 : } 0,458 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 34,077$$

$$\text{Replikasi 2 : } 0,455 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 33,846$$

$$\text{Replikasi 3 : } 0,440 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 32,692$$

$$\text{Replikasi 4 : } 0,430 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 31,923$$

$$\text{Replikasi 5 : } 0,442 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 32,846$$

$$\text{Replikasi 6 : } 0,457 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 34$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{0,876}{33,231} \times 100$$

$$= 2,636$$

- Adisi 45%

$$\text{Replikasi 1 : } 0,553 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 41,385$$

$$\text{Replikasi 2 : } 0,523 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 39,077$$

$$\text{Replikasi 3 : } 0,555 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 41,538$$

$$\text{Replikasi 4 : } 0,527 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 41,692$$

$$\text{Replikasi 5 : } 0,5 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 37,308$$

$$\text{Replikasi 6 : } 0,523 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 39,077$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{1,801}{40,001} \times 100$$

$$= 4,502$$

- Adisi 60%

$$\text{Replikasi 1 : } 0,606 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 45,466$$

$$\text{Replikasi 2 : } 0,623 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 46,769$$

$$\text{Replikasi 3 : } 0,615 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 46,154$$

$$\text{Replikasi 4 : } 0,6 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 45$$

$$\text{Replikasi 5 : } 0,603 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 45,231$$

$$\text{Replikasi 6 : } 0,6 = 0,013x + 0,015$$

$$x = 45$$

$$\begin{aligned} \% \text{ RSD} &= \frac{0,714}{45,603} \times 100 \\ &= 1,566 \end{aligned}$$

D. Limit of Detection dan Limit of Quantitation

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000$$

$$\begin{aligned} 100 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 2,5 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

- $2 \text{ ppm} \rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 2 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 0,2$$

- 5 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 5 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 0,5$$

- 10 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 1$$

- 20 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 2$$

- 40 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 40 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 4$$

- 60 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 60 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 6$$

- 80 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 80 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 8$$

Konsentrasi	Absorbansi	Yi	Y-Yi	(Y-Yi) ²
0	0	0,032		
2	0,047	0,05	-0,003	9E-06
5	0,09	0,077	0,013	0,000169
10	0,141	0,122	0,019	0,000361
20	0,211	0,212	-0,001	0,000001
40	0,372	0,392	-0,02	0,0004
60	0,542	0,572	-0,03	0,0009
80	0,705	0,752	-0,047	0,002209
100	0,906	0,932	-0,026	0,000676
$\sum (Y-Yi)^2$				0,004725
$S (y/x)^2$				0,000675
$S (y/x)$				0,025980
LOD				8,66
LOQ				28,867

Persamaan regresi $\rightarrow y = 0,009x + 0,032$

$$\begin{aligned}
 S (y/x)^2 &= \frac{\sum (Y - Y_i)^2}{N - 2} \\
 &= \frac{0,004725}{9 - 2} \\
 &= 0,000675
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 S (y/x) &= \sqrt{0,000675} \\
 &= 0,025980
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 LOD &= \frac{3 \cdot S (y/x)}{b} \\
 &= \frac{3 \cdot 0,025980}{0,009} \\
 &= 8,66
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 LOQ &= \frac{10 \cdot S (y/x)}{b} \\
 &= \frac{10 \cdot 0,025980}{0,009} \\
 &= 28,867
 \end{aligned}$$

Lampiran 9. Perhitungan Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji

Kakao

A. Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Etanol Biji Kakao

$$1800 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000$$
$$= 18 \text{ mg}$$

Penimbangan yang diperoleh :

Replikasi 1 = 18 mg

Replikasi 2 = 17,9 mg

Replikasi 3 = 18 mg

B. Perhitungan Konsentrasi Analisis

Persamaan regresi $\rightarrow y = 0,012x + 0,02$

- Replikasi 1 $\rightarrow 0,49 = 0,012x + 0,02$

$$x = 39,167$$

- Replikasi 2 $\rightarrow 0,48 = 0,012x + 0,02$

$$x = 38,333$$

- Replikasi 3 $\rightarrow 0,49 = 0,012x + 0,02$

$$x = 39,167$$

C. Perhitungan Penetapan Kadar Flavonoid

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{\text{konsentrasi } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \text{volume sampel}}{\text{berat sampel}} \times \text{fp}$$

- Replikasi 1

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{39,167 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \text{ mL}}{18 \text{ mg}} \times 10$$

$$= 217,594 \mu\text{g}/\text{mg} \rightarrow 0,218 \text{ mg/g}$$

$$\text{ppm} = \frac{0,218 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000$$

$$= 21,8 \text{ ppm}$$

- Replikasi 2

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{38,333 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \text{ mL}}{17,9 \text{ mg}} \times 10$$

$$= 214,151 \mu\text{g}/\text{mg} \rightarrow 0,214 \text{ mg/g}$$

$$\text{ppm} = \frac{0,214 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000$$

$$= 21,4 \text{ ppm}$$

- Replikasi 3

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{39,167 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \text{ mL}}{18 \text{ mg}} \times 10$$

$$= 217,594 \mu\text{g}/\text{mg} \rightarrow 0,218 \text{ mg/g}$$

$$\text{ppm} = \frac{0,218 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000$$

$$= 21,8 \text{ ppm}$$

$$\text{Rata-rata kadar flavonoid total} = \frac{21,8 + 21,4 + 21,8}{3}$$

$$= 21,667 \text{ ppm}$$

- Rata-rata kadar flavonoid + SD $\rightarrow 21,667 + 0,482$

$$22,152 \text{ ppm}$$

- Rata-rata kadar flavonoid – SD $\rightarrow 21,667 - 0,482$

$$21,185 \text{ ppm}$$