

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL
KULIT BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN
METODE DPPH (1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl)**

SKRIPSI



Oleh:

Ach Naufal Firdaus

NIM 18040001

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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL
KULIT BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN
METODE DPPH (1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl)**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh
Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm)



Oleh:

Ach Naufal Firdaus

NIM 18040001

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

HALAMAN PERSETUJUAN

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

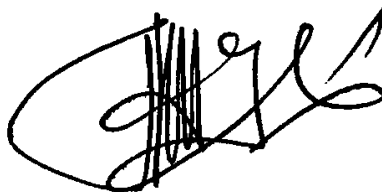
Jember, 08 September 2022

Pembimbing Utama



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

Pembimbing Anggota



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 0703068903

HALAMAN PENGESAHAN

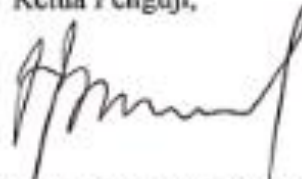
Skripsi yang berjudul "*Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)*" telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Hari : Senin

Tanggal : 26 September 2022

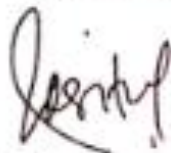
Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi

Ketua Penguji,



Drs. Hendro Prasetyo, S. Kep. Ns., M. Kes
NIDN. 4027035901

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 Melody Tursina, S. Kep. Ns., M. Kep
NIDN. 0706109104

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL KULIT BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN METODE DPPH (1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl)

Oleh:

Ach Naufal Firdaus
NIM. 18040001

Pembimbing

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

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

LEMBAR PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim....

Puji syukur alhamdulillah senantiasa ku panjatkan kepada Allah SWT atas karunia-Nya yang begitu besar dilimpahnya rahmat dan ridho-nya yang senantiasa selalu memberikan kemudahan, kelancaran, petunjuk, dan keyakinan yang luar biasa kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini tepat pada waktunya.

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orangtua saya (Ayah Masrul dan Ibu Masruroh), Kakak saya Alfian Nur Firdaus (Bangapi) serta istrinya (Mbak Ani), kedua adik saya (Robith Auliya Firdaus dan Viona Almafruhah Firdausy) yang telah memberikan segenap kasih sayang, cinta, waktu, semangat, biaya, dan doa-doanya untuk membesarkan saya, sehingga saya sampai pada titik ini dan menyandang gelar S.Farm.
2. Terimakasih kepada semua Dosen dan keluarga Universitas dr. Soebandi Jember yang telah memberikan ilmu pengetahuan, dan memberikan banyak motivasi selama saya duduk di bangku perkuliahan. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan ibu dan bapak dosen.
3. Terimakasih juga kepada tim penelitian Aden, Dwi dan Dhea, serta teman-teman se-angkatan (angkatan 18), khususnya kelas 18A Farmasi dan tidak lupa juga teman kontrakan (Aden dan Dio) yang telah memberikan semangat, dukungan, serta ide-ide hingga saya mampu memperjuangkan proses-proses

untuk meraih gelar sarjana farmasi yang telah dinantikan dan dibanggakan.

4. Terimakasih juga kepada kerabat dan orang yang saya cintai yang telah memberikan semangat, dukungan, serta doa-doa baik yang telah diberikan kepada saya dalam proses-proses untuk meraih gelar sarjana farmasi yang telah saya nantikan dan saya banggakan.

MOTTO

Iya memang sesulit itu, semakin taat hamba-Nya kepada-Nya, maka Allah akan mengujinya habis-habisan untuk meninggikan derajat hamba-Nya, yakin mau nyerah?

(Anonim)

Waktu terlalu lambat bagi orang yang menunggu, terlalu lama bagi orang yang berduka, terlalu singkat bagi orang yang bergembira, semua orang punya waktu, tapi tidak banyak yang bias menggunakannya dengan baik

(Anonim)

ABSTRAK

Firdaus, Ach Naufal* Prasetyo, Hendro** Setyaningrum, Lindawati***.2022. **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pycrylhydrazyl).** Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang: Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) berasal dari famili *Sterculiaceae*. Indonesia menduduki peringkat ketiga sebagai pembudidaya tanaman kakao terbanyak di dunia setelah Ivory Coast dan Ghana. Kulit biji kakao (sekitar 15 % dari berat total biji kakao) merupakan limbah dari industri pengolahan coklat. Kulit biji kakao berpeluang untuk dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak metanol kulit biji kakao dengan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pycrylhydrazyl).

Metode: Serbuk simplisia kulit biji kakao diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol selama 5x 24 jam, kemudian diskriming. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH dengan pembandingan kuersetin yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm.

Hasil Penelitian: Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol kulit biji kakao menunjukkan adanya senyawa alkaloid, triterpenoid, flavonoid, saponin dan tannin. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol kulit biji kakao menunjukkan nilai IC_{50} dengan rata-rata $21.37 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$, sedangkan pembandingan kuersetin memiliki nilai IC_{50} dengan rata-rata $5.52 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$.

Kesimpulan: ekstrak metanol kulit biji kakao memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori kuat sedangkan pembandingan kuersetin memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat.

Kata Kunci: Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.), kuersetin, DPPH, IC_{50}

*Peneliti

**Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Firdaus, Ach Naufal Firdaus* Prasetyo, Hendro** Setyaningrum, Lindawati***2022. **Antioxidant Activitiy Assay From Methanol Extract Of Cocoa Bean Husk (*Theobroma cacao* L.) With DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pycrylhdyrazyl).** Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program University of dr. Soebandi.

Background: Cocoa bean husk (*Theobroma cacao* L.) belongs to family: *Sterculiaceae*. Indonesia is the third largest position as cocoa cultivator in the world after Ivory Coast and Ghana. Cocoa bean husk (about 15% of the total weight of cocoa beans) is a waste from the chocolate processing industry. Cocoa bean husk has the potential to be used as natural antioxidant source. This study aims to determine the antioxidant activity of methanol extract of cocoa bean husk with DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pycrylhdyrazyl).

Methods: Cocoa bean husk simplicia powder was macerated by using methanol for 5x 24 hours, then screened. Antioxidant activity test was conducted by using DPPH method with quercetin as a comparison. It was measured using UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 515 nm.

Results: The results of the phytochemical screening of the extract showed the presence of alkaloids, triterpenoids, flavonoids, saponins and tannins. Results of antioxidant activity test from methanol extract of cocoa bean husk obtained an IC₅₀ with an average of 21.37 ± 1.03 µg/mL, while quercetin had an IC₅₀ with an average 5.52 ± 0.18 µg/mL.

Conclusion: Methanol extract of cocoa bean husk had an antioxidant activity in strong category, while the quercetin had antioxidant activity in very strong category.

Keywords: Cocoa bean husk (*Theobroma cacao* L.), quercetin, DPPH, IC₅₀

*Author

**Advisor 1

***Advisor 2

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, Tuhan semesta alam, yang mana atas segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya yang tiada terkira besarnya sehingga peneliti dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)”** dapat terselesaikan untuk memenuhi sebagian persyaratan dalam mencapai derajat Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi. Karya ini tidak akan berhasil tanpa bimbingan, arahan dan kerjasama dari berbagai pihak.

Peneliti menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak akan terwujud tanpa adanya bantuan dan dorongan baik moral maupun materi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini peneliti menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Drs. H. Said Mardijanto, S.Kep., Ns., MM selaku Ketua Universitas dr. Soebandi
2. Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kep. selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3. Dhina Ayu Susanti, M. Kes., Apt selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
4. Dr. Apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M. Farm selaku Dosen Pembimbing Utama dan apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku Dosen Pembimbing Anggota atas segala bimbingan, saran, arahan dan nasehatnya.

5. Segenap Dosen pendidik semua mata kuliah di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi.

Jember, 18 Mei 2022

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'A' followed by several loops and a final flourish.

Ach Naufal Firdaus

NIM 18040001

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI.....	v
LEMBAR PERSEMBAHAN	vii
MOTTO.....	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB 1	1
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 Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti	5
1.4.2 Manfaat Bagi Peneliti Lain	5
1.4.3 Manfaat Bagi Masyarakat	6
1.4.4 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan	6
1.5 Keaslian Penelitian	6
BAB II.....	8
TINJAUAN PUSTAKA	8

2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	8
2.1.1 Morfologi Tanaman	8
2.1.2 Klasifikasi Tanaman	12
2.1.3 Kandungan Kimia	12
2.1.4 Peneilitian Kulit Biji Kakao.....	13
2.1.5 Manfaat Untuk Kesehatan	13
2.2 Radikal Bebas	14
2.2.1 Definisi Radikal Bebas	14
2.2.2 Sumber Radikal Bebas.....	14
2.2.3 Mekanisme Radikal Bebas.....	15
2.3 Antioksidan	16
2.3.1 Definisi	16
2.3.2 Sumber Antioksidan	16
2.3.3 Mekanisme Antioksidan	17
2.4 Uji Aktivitas Antioksidan.....	17
2.4.1 DPPH	17
2.4.2 Tingkat Kekuatan.....	18
2.5 Tinjauan Metode Ekstraksi.....	19
2.5.1 Definisi Ekstraksi.....	19
2.5.2 Jenis-jenis Ekstraksi (Dirjen POM, 1986)	19
2.5.3 Pelarut	21
2.6 Instrumen Spektrofotometer UV-VIS	22
2.6.1 Definisi Spektrofotometer UV-VIS.....	22
2.6.2 Jenis Spektrofotometer UV-VIS.....	22
2.6.3 Bagian Spektrofotometer UV-VIS.....	24
BAB 3	27
KERANGKA KONSEPTUAL	27
3.1 Kerangka Konseptual	27
BAB 4.....	29
METODE PENELITIAN	29
4.1 Jenis Penelitian	29

4.2 Populasi	29
4.3 Sampel Penelitian	29
4.4 Determinasi Tanaman.....	29
4. 5 Variabel Penelitian	30
4.5.1 Variabel Bebas.....	30
4.5.2 Variabel Terikat	30
4.5.3 Variabel Terkendali	30
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian	30
4.7 Definisi Operasional.....	31
4.8 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data	33
4.8.1 Alat dan Bahan.....	33
4.8.2 Teknik Pengambilan Data.....	33
BAB 5	38
HASIL PENELITIAN.....	38
5.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	38
5.1.1 Hasil Determenasi Tanaman.....	38
5.1.2 Ekstraksi	38
5.1.3 Skrining Fitokimia	39
5.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	39
5.5.1 Optimasi Panjang Gelombang	39
5.2.2 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin.....	40
5.2.3 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	41
5.2.4 Pengukuran Absorbansi Kuersetin dan Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	43
5.2.5 Hasil Analisis Nilai IC ₅₀ Kuersetin dan Ekstrak Kulit Biji Kakao	44
BAB 6	46
PEMBAHASAN PENELITIAN.....	46
6.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Biji Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	46
6.1.1 Ekstrak Kulit Biji Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	46

6.1.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) ..	47
6.2 Analisis Nilai Inhibisi Konsentrasi 50% (IC ₅₀)	50
BAB 7	55
KESIMPULAN DAN SARAN.....	55
7.1 Kesimpulan.....	55
7.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA.....	57

DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1 Keaslian Penelitian.....	6
Tabel 2. 1 Tingkat Kekuatan IC ₅₀ (Nasution et al., 2015)	18
Tabel 4. 1 Definisi Operasional	31
Tabel 5. 1 Hasil Ekstrak Kulit Biji Kakao	38
Tabel 5. 2 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao	39
Tabel 5. 3 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin	Error! Bookmark not defined.
Tabel 5. 4 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao	42
Tabel 5. 5 Hasil Absorbansi Pengujian Kuersetin	43
Tabel 5. 6 Hasil Absorbansi Pengujian Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao.....	44
Tabel 5. 7 Hasil Nilai IC ₅₀ Kuersetin dan Ekstrak Kulit Biji Kakao	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Tanaman Kakao.....	11
Gambar 2. 2 single-beam instrument	23
Gambar 2. 3 double-beam instrument.....	24
Gambar 3. 1 Kerangka Konsep	27
Gambar 5.1 Kurva Panjang Gelombang DPPH	40
Gambar 5. 2 Grafik Linier Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin Terbaik.....	41
Gambar 5. 3 Grafik Linier Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Terbaik.....	42
Gambar 6. 1 Mekanisme DPPH Akseptor (Yuhernita & Juniarti, 2011).....	52
Gambar 6. 2 Mekanisme Peredaman Radikal Bebas oleh Flavonoid (Kandaswami & Midelton, 1997).....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi Tumbuhan.....	64
Lampiran 2 Proses Pembuatan Ekstrak.....	65
Lampiran 3 Perhitungan Rendemen.....	66
Lampiran 4 Skrining Fitokimia.....	67
Lampiran 5 Optimasi Panjang Gelombang.....	69
Lampiran 6 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin.....	70
Lampiran 7 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao	72
Lampiran 8 Perhitungan Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	74
Lampiran 9 Dokumentasi Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	79
Lampiran 10 Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC ₅₀ Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao	80
Lampiran 11 Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC ₅₀ Kuersetin.....	83
Lampiran 12 Photometry Test Report Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao dan Kuersetin	86
Lampiran 13 Tabel Probit	88

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung elektron yang tidak berpasangan pada orbital paling luar (Tristantini *et al.*, 2016). Radikal bebas bersifat tidak stabil dan sangat reaktif yakni cenderung bereaksi dengan molekul lainnya untuk mencapai kestabilan. Radikal dengan kereaktifan yang tinggi ini dapat memulai sebuah reaksi berantai dalam sekali pembentukannya sehingga menimbulkan senyawa yang tidak normal dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh. Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh sebagai bagian dari hasil proses metabolisme. Sedangkan radikal bebas yang bersumber dari luar tubuh dapat disebabkan oleh faktor lingkungan, termasuk kebiasaan merokok, penggunaan pestisida pada makanan, polusi dan radiasi. Radikal bebas dapat diatasi dengan penggunaan antioksidan (Tristantini *et al.*, 2016).

Tubuh memiliki antioksidan sebagai mekanisme pertahanan tubuh untuk menetralkan radikal bebas yang terbentuk. Antioksidan merupakan inhibitor proses oksidasi, bahkan pada konsentrasi yang relatif kecil. Antioksidan ini dapat berkurang dan habis dengan cepat, menyebabkan gangguan pada status equilibrium dari sistem prooksidan dan antioksidan pada sel *intake*. Faktor yang berperan atas penurunan produksi antioksidan adalah infeksi bakteri, virus atau inflamasi kronik dan proses penuaan (Andarina & Djauhari, 2017).

Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007).

Antioksidan dibagi menjadi dua, yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Adapun antioksidan endogen adalah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh sendiri. Jika jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih, maka antioksidan endogen saja tidak cukup atau tidak mampu mengendalikan jumlah radikal bebas tersebut sehingga dapat mengakibatkan stress oksidatif. Maka dari itu, diperlukan asupan antioksidan dari luar tubuh yang disebut antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen bisa berasal dari sayur-sayuran dan buah-buahan. Salah satu antioksidan eksogen yaitu buah kakao (*Theobroma cacao* L.) (Andarina and Djauhari, 2017)

Indonesia menduduki peringkat ketiga sebagai pembudidaya tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) terbanyak di dunia setelah Ivory Coast dan Ghana. Salah satu pusat penelitian kopi dan kakao di Indonesia yang berada di Desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember, telah berdiri sejak tahun 1911 dan merupakan lembaga penelitian kopi dan kakao yang memiliki lahan se-luas 160 hektar perkebunan.

Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) (sekitar 15 % dari berat total biji kakao) merupakan limbah dari industri pengolahan cokelat. Perkiraan kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang dihasilkan industri pengolahan kakao pada tahun 2012 sebanyak 52.500 ton per tahun dan meningkat menjadi 60.000 ton pada tahun 2014.

Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) berpeluang untuk dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan. Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung senyawa aktif yang tidak berbeda jauh dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dan biji kakao (*Theobroma cacao* L.) itu sendiri (Prasetya *et al.*, 2020). Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung senyawa aktif antara lain polifenol, flavonoid, terpenoid/steroid, tanin terkondensasi atau terpolimerisasi seperti katekin dan antosianin yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan dalam ekstrak kakao (*Theobroma cacao* L.) diketahui dapat menghambat pertumbuhan sel kanker hingga 70 % dengan menghalangi aliran sel pada fase pertumbuhan kedua (Diantika *et al.*, 2014). Flavonoid adalah senyawa polifenol yang bersifat polar dan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, air, aseton, butanol, dimetil formamida, dimetil sulfoksida (Wahyuningtyas *et al.* 2017).

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl). DPPH (1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl) secara luas digunakan untuk mengukur dan membandingkan aktifitas antioksidan senyawa-senyawa fenolik, dan evaluasi aktifitas antioksidan melalui perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning.(A, Jusmiati *et al.*, 2019). Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil) digunakan untuk menguji kemampuan suatu komponen sebagai penangkap radikal bebas dalam suatu bahan atau ekstrak (Rorong, 2008). Keunggulan dari metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil) adalah dapat

dikerjakan secara cepat dan sederhana. Aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration* 50%). Nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas (Pamarti, 2005).

Berdasarkan dari penjelasan di atas, maka dilakukan uji aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan pelarut metanol. Dalam penelitian Hartati *et al.* (2013) mengenai aktivitas antioksidan dan antibakteri pada uji mahoni dengan menggunakan pelarut metanol, etanol, dan aseton menunjukkan bahwa ekstrak biji mahoni menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi pada pelarut metanol. Penelitian ini bertujuan untuk melihat seberapa besar potensi antioksidan dari ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) tersebut. Metode penelitian ini menggunakan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl*) dengan spektrofotometer UV-Vis (*Ultra Violet-Visible*).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dirumuskan adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat senyawa fitokimia pada ekstraksi metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang berfungsi sebagai antioksidan ?
2. Berapa nilai inhibisi konsentrasi 50% pada ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil*) ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil)

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa fitokimia yang berfungsi sebagai antioksidan pada ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.).
2. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa nilai IC₅₀ pada ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil).

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat.

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Dapat diketahui aktivitas antioksidan yang terkandung pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil).

1.4.2 Manfaat Bagi Peneliti Lain

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan referensi dalam penelitian selanjutnya untuk pencarian antioksidan baru dari bahan alam dan sebagai

sumber informasi yang dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam penelitian selanjutnya tentang aktivitas antioksidan.

1.4.3 Manfaat Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan memberi pengetahuan baru bagi masyarakat dalam bidang kesehatan dan pengetahuan alam tentang potensi antioksidan ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

1.4.4 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi penambahan ilmu pengetahuan, khususnya bagi ilmu kefarmasian yang mengenai antioksidan serta menjadi bahan bacaan di perpustakaan dan dapat menjadi referensi bagi mahasiswa lain.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1. 1 Keaslian Penelitian

Penelitian	Persamaan	Perbedaan
(Utami <i>et al.</i> , 2017)	a) Menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) b) Menggunakan	a) Menggunakan pelarut aseton 70%

	sampel kulit biji kakao <i>(Theobroma cacao L.)</i>	
Prasetya <i>et al.</i> , 2020	a) Menggunakan pelarut metanol	a) Tidak melakukan uji aktivitas antioksidan
Rahmadhani <i>et al.</i> , 2020	a) Menggunakan metode DPPH <i>(1,1-diphenyl-2- picrylhidrazil)</i> b) Menggunakan metode ekstraksi maserasi	a) Menggunakan pelarut etanol 96%

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1 Morfologi Tanaman

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) termasuk dalam famili dari Malvaceae dan genus *Theobroma*, yang merupakan tanaman asli hutan hujan neotropis dengan lebih dari 10 tanaman yang diketahui (Jean-Marie *et al.*, 2021). Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) adalah salah satu jenis tanaman penyegar yang memiliki nilai tinggi dalam bidang ekonomi. Habitat asli tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) sendiri adalah hutan tropis dengan curah hujan dan kelembapan yang tinggi sehingga tanaman bisa tumbuh tinggi (Budi, 2020).

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) tumbuh liar di lembah Amazon dan daerah tropis lainnya di Amerika Tengah dan Selatan, kemudian menyebar di beberapa negara seperti Kolombia, Costa Rika, Pantai Gading, Republik Demokrasi Kongo, Dominika, Ekuador, Gabon, Ghana, Guinea, India, Indonesia, Jamaika, Madagaskar, Malaysia, Nigeria, Papua Nugini, Filipina, Samoa, Sao Tome et Principe, Sierra Leone, Srilanka, Suriname, Tanzania, Togo, Trinidad, dan Tobago, Uganda, serta Venezuela (Budi, 2020).

Menurut penelitian Budi (2020) batang tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) tumbuh tegak, tinggi tanaman di kebun pada umur 3 tahun dengan kisaran 1,8-3 meter dan pada umur 12 tahun bisa mencapai 4,5-7 meter, sedangkan tanaman

kakao (*Theobroma cacao* L.) yang tumbuh liar ketinggiannya bisa mencapai 20 meter. Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) diperbanyak yang banyak dengan biji akan membentuk batang utama sebelum tumbuh beberapa cabang primer. Letak percabangan primer disebut jorket dengan ketinggian 1,2-1,5 meter dari permukaan tanah. Jorket tidak ditemukan pada tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperbanyak secara vegetatif. Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki dua bentuk cabang, yaitu cabang orthotrop dan cabang plagiotrop. Cabang orthotrop adalah cabang yang tumbuh ke atas, sedangkan cabang plagiotrop adalah cabang yang tumbuh ke samping.

Warna daun dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) bervariasi dari kecokelatan, cokelat, cokelat kemerahan, merah kecokelatan, kemerahan, merah, merah muda, merah cerah, merah tua, dan kuning kemerahan. Daun muda berwarna kuning, kuning cerah, cokelat, merah kecokelatan, hijau kecokelatan, hijau kemerahan, dan hijau, panjang daun 10-48 cm dan lebar antara 4-20 cm. Permukaan atas daun tua hijau dan tua hijau dan bergelombang, sedangkan permukaan bawah daun tua berwarna hijau muda, kasar dan bergelombang. Daun kakao adalah daun tunggal (*folium simplex*), pada tangkai daun hanya terdapat satu helaian daun. Tangkai daun (*petiolus*) berbentuk silinder dan bersisik halus (tergantung pada tipenya), pangkal membulat, ujung runcing sampai meruncing dengan panjang $\pm 25-28$ mm dan diameter $\pm 3-7,4$ mm. Warna tangkai daun bervariasi, yaitu hijau, hijau kekuningan, dan hijau kecokelatan. Bangun daunnya bulat memanjang (*oblongus*). Ujung daun (*apexfolii*) meruncing (*acuminatus*) dan pangkal daun (*basisfolii*) berbentuk runcing (*acutus*), kedua tepi daunnya di kanan

dan kiri ibu tulang daun sedikit demi sedikit menuju ke atas dan pertemuannya di puncak daun yang membentuk sudut lancip. Tepi daun (*margofolii*) rata (*integer*) sampai agak bergelombang, daging daun tipis tetapi kuat seperti perkamen. Susunan tulang daun (*nervatio*) menyirip (*penninervis*), hanya mempunyai satu ibu tulang daun yang berjalan dari pangkal keujung daun dan merupakan terusan dari tangkai daun, alur tulang daun tampak jelas.

Untuk memperkuat tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) berdiri tegak, akar tanaman ini juga berfungsi untuk menyerap air dan zat-zat makanan yang terlarut di dalam air dari dalam tanah serta mengangkut air dan zat-zat makanan ke tempat yang memerlukan seperti batang dan daun. Akar tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan akar tunggang dan berkembang di sekitar permukaan tanah kurang lebih sampai 30 cm.

Selain itu, tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) juga mempunyai bunga yang kemudian dapat menjadi buah. Bunga kakao kecil dan halus berwarna putih sedikit ungu kemerahan dan tidak berbau, diameter bunga 1-2 cm. Bunga kakao tergolong bunga sempurna karena terdiri dari daun kelopak (*calyx*) sebanyak 5 helai berwarna merah muda dan benang sari (*androecium*) sebanyak 10 helai. Panjang tangkai bunga 2-4 cm.

Buah kakao berupa buah buni dengan daging bijinya sangat lunak. Bentuk, ukuran dan warna buah kakao bervariasi dan merupakan salah satu karakter penting sebagai penciri perbedaan antara genotipe kakao. Permukaan buah halus, agak halus, agak kasar dan kasar dengan alur sekitar 10 dengan tebal antara 1-2 cm. Panjang buah 16,2-20,50 dengan diameter 8-10,07 cm. Buah muda bervariasi

warnanya, yaitu merahmuda, merahmuda keputihan, merahmuda kecokelatan, merah kecokelatan, merah kehijauan, merah kusam, merah, merah tua, merah tua mengkilap, hijaumuda, hijaumuda keputihan, kehijauan, hijau, dan kecokelatan. Buah masak berwarna merah kekuningan, kuning kemerahan, kuning cerah, kuning agak kehijauan dan orange. Buah kakao terdiri dari 3 komponen utama, yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen terbesar dari buah kakao yaitu kulit buah (lebih dari 70% berat buah masak). Persentase biji kakao dalam buah antara 27-29%, sisanya plasenta yang merupakan pengikat dari sekitar 30-40 biji yang terdapat dalam buah (Mulato, 2005).

Menurut penelitian Budi (2020) biji kakao dapat dibagi menjadi tiga bagian, yaitu kotiledon (87,10%), kulit (12%) dan lembaga (0,9%). Biji kakao berbentuk bulat telur agak pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 cm. Biji kakao diselimuti lendir (*pulp*) berwarna putih. Lapisan yang lunak dan rasanya manis, jika telah masak lapisan tersebut dinamakan *pulp* atau *micilage*. *Pulp* dapat menghambat perkecambahan, oleh karena itu harus dibuang untuk menghindari kerusakan biji.



Gambar 2. 1 Tanaman Kakao

2.1.2 Klasifikasi Tanaman

Berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2021), taksonomi dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivision	: Embryophyta
Division	: Tracheophyta
Subdivision	: Spermathophytina
Class	: Magnoliopsida
Superorder	: Rosanae
Order	: Malvales
Family	: Malvaceae
Genus	: Theobroma L.
Species	: <i>Theobroma cacao</i> L.

2.1.3 Kandungan Kimia

Kulit biji kakao mengandung senyawa aktif yang tidak jauh berbeda dari kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kulit buah maupun biji buah kakao itu sendiri (Prasetya *et al.*, 2020). Pada penelitian Kayaputri *et al.* (2014) tentang skrining fitokimia pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.), kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Sedangkan pada analisis fitokimia menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) menunjukkan ekstrak kulit biji

kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung 2,3-butanediol (6,45%), *benzeneaceticacid* (2,33%), *caffeine* (23,51%), dan *theobromine* (65,99%). Menurut penelitian (Kusuma *et al.*, 2013), kulit biji kakao mengandung senyawa polifenol 5-18%, katekin 33-42%, leukosianidin 23-25%, dan antosianin 5%. Senyawa antioksidan dalam ekstrak kulit biji kakao dapat menghambat pertumbuhan sel kanker hingga 70% dengan menghalangi aliran sel pada fase pertumbuhan kedua (Diantika *et al.*, 2014).

2.1.4 Peneilitian Kulit Biji Kakao

Penelitian tentang uji antioksidan pada kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.), sebelumnya pernah dilakukan oleh Prasetya *et al.* (2020) yaitu “Pengaruh Jenis Pelarut dan Waktu Maserasi terhadap Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Sumber Antioksidan”, menunjukkan kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan pelarut etanol dan waktu maserasi 48 jam adalah perlakuan terbaik untuk menghasilkan antioksidan yaitu dengan karakteristik rendemen $11,72 \pm 0,45$ %, total fenolik $80,76 \pm 1,12$ mg GAE/g dan kapasitas antioksidan $49,55 \pm 1,13$ mg GAEAC/g.

2.1.5 Manfaat Untuk Kesehatan

Bagian tubuh dari pohon kakao (*Theobroma cacao* L.) hampir seluruhnya dapat dimanfaatkan untuk kesehatan, mulai dari daun , buah, biji maupun limbah pengolahan biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yaitu kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Ekstrak kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung senyawa prosianidin yang dapat menyebabkan hingga mencapai 70% dalam menghambat

pertumbuhan sel kanker dengan cara memblokir aliran sel pada fase pertumbuhan kedua atau G2 (Kelishadi, 2005).

2.2 Radikal Bebas

2.2.1 Definisi Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan molekul yang terbentuk apabila molekul oksigen berikatan dengan molekul lain yang menghasilkan elektron ganjil. Molekul oksigen memiliki elektron berpasangan yang stabil, jika terdapat elektron yang tidak berpasangan pada orbit luarnya, maka oksigen akan bersifat reaktif dan tidak stabil (Bauman dan Alleman, 2009). Molekul oksigen yang tidak berpasangan ini akan mencari dan merebut elektron dari komponen vital didekatnya untuk melepaskan energi ekstra dan kembali ke kondisi stabil. Apabila radikal bebas tidak berikatan dengan antioksidan maka reaksi oksidasi akan terus berlanjut atau membentuk kaskade yang menyebabkan kerusakan sel (Chen L, 2012).

2.2.2 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas terbentuk secara endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen dibentuk secara fisiologis dari hasil metabolisme normal tubuh. Radikal bebas juga dapat dibentuk dari sumber enzimatik dan non-enzimatik. Endogen enzimatik berasal dari metabolisme oksigen pada mitokondria yaitu mitokondrial oksidase, monoamin oksidase, mieloperoksidase, xantin oksidase dan nitrit oksidase sintatase. Endogen non-enzimatik adalah hidrogen peroksida yang merupakan kunci reaksi *fenton*. Pada reaksi *fenton*, hidrogen peroksida bereaksi dengan besi

atau tembagadan terbentuk radikal hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) yang merupakan radikal bebas paling tidak stabil. Radikal bebas eksogen berasal dari lingkungan seperti radiasi ultraviolet, obat, polusi udara dan asap rokok. Pembentukan radikal bebas paling banyak disebabkan UVA (Ultra Violet A). Paparan UV berarti terdapat transmisi foton energik melalui lapisan kulit dan diabsorpsi molekul sel kromofor atau *photosensitizer* sehingga timbul efek biologik (Andarina & Djauhari, 2017).

2.2.3 Mekanisme Radikal Bebas

Tubuh memiliki antioksidan sebagai pertahanan terhadap radikal bebas, tetapi seiring bertambahnya usia dan radikal bebas bertambah banyak, sistem ini kurang efektif. Ketidakseimbangan faktor prooksidan (radikal bebas) dan antioksidan akan menimbulkan stress oksidatif, menyebabkan kerusakan seluler pada lipid, karbohidrat, protein dan struktur DNA irreversibel. Pada lipid terjadi proses peroksidasi oleh enzim lipid peroksidase dengan mengambil atom hidrogen yang berasal dari *poly unsaturated fatty acid* (PUFA), sehingga asam lemak tidak jenuh yang berada dalam membran menjadi rentan terhadap oksidasi. Pada karbohidrat terbentuk radikal bebas karbon bebas dan hidrogen bebas. Komponen karbohidrat membran plasma diikat oleh radikal bebas secara kovalen sehingga membentuk *carbon centered radical*. *Carbon centered radical* berinteraksi dengan molekul karbohidrat lain sehingga terjadi reaksi rantai autokatalitik dan menimbulkan kerusakan membran sel. Proses oksidasi pada protein akan membentuk radikal bebas berupa alkilperoksida dan radikal karbonil. Alkilperoksida dapat menimbulkan fragmentasi protein sedangkan radikal

karbonil dapat membuat pemecahan rantai polipeptida sehingga meningkatkan proteolisis (Andarina & Djauhari, 2017).

2.3 Antioksidan

2.3.1 Definisi

Antioksidan merupakan komponen kimia yang terdiri dari monohidroksil atau polihidroksil fenol. Antioksidan juga merupakan inhibitor dari proses oksidasi, bahkan pada konsentrasi yang relatif kecil sekalipun yang berfungsi menambahkan atau menghilangkan satu elektron untuk menetralkan radikal bebas, sehingga radikal bebas menjadi stabil dan menghambat proses oksidasi (Andarina & Djauhari, 2017).

2.3.2 Sumber Antioksidan

Antioksidan dibagi menjadi 2, yaitu antioksidan enzimatik dan antioksidan non-enzimatik. Antioksidan enzimatik merupakan antioksidan yang berasal dari dalam tubuh kita yaitu berupa enzim seperti superoksida dismutase, glutathione peroxidase, peroxidase dan katalase. Antioksidan non-enzimatik merupakan antioksidan yang bersumber dari alam (antioksidan alami) atau antioksidan yang didapat dari hasil sintesis reaksi kimia (antioksidan sintetis) (Yuslianti, 2017).

Antioksidan alami dapat berupa tumbuh-tumbuhan atau buah-buahan serta bagian dari tumbuhan itu sendiri seperti daun, batang, akar, biji, hingga kulit biji yang mempunyai kandungan kimia yang berguna sebagai antioksidan seperti asam amino, asam askorbat, golongan flavonoid, tannin, dan lain sebagainya. Salah satu contoh antioksidan alami adalah kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Kulit biji

kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid (Kayaputri *et al.*, 2014).

2.3.3 Mekanisme Antioksidan

Secara umum, mekanisme kerja antioksidan yaitu menghambat oksidasi lemak. Antioksidan dapat menghambat reaksi peroksidasi lipid melalui mekanisme pembersihan senyawa oksigen reaktif atau penurunan konsentrasinya secara lokal, pembersihan ion logam katalitik, dan pemutusan rantai dari rangkaian reaksi yang diinisiasi oleh radikal bebas, sehingga antioksidan bisa disebut antioksidan pencegah. Sedangkan melalui mekanisme pembersihan radikal bebas yang berfungsi sebagai inisiator seperti hidroksil, peroksil dan aloksil, antioksidan juga berfungsi sebagai antioksidan pencegah, hanya saja mekanismenya dilakukan oleh enzim, seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase dan katalase (Yuslianti, 2017).

2.4 Uji Aktivitas Antioksidan

2.4.1 DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Pemilihan metode ini karena merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat dan serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan. Mekanisme kerja dari metode DPPH adalah mereaksikan antioksidan yang terdapat pada sampel dengan DPPH di mana antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya sehingga akan menghambat aktivitas dari radikal bebas.

Larutan radikal bebas DPPH memiliki atom nitrogen yang tidak berpasangan. Reaksi DPPH dengan atom hidrogen yang terdapat dalam antioksidan dapat membuat larutan DPPH menjadi berkurang reaktivitasnya yang ditunjukkan dengan memudarnya warna ungu menjadi kuning (Yahya & Nurrosyidah, 2020).

2.4.2 Tingkat Kekuatan

Nilai IC_{50} adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji ($\mu\text{g/mL}$) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50%. Nilai 0% menunjukkan tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% menunjukkan peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi ($Y=AX+B$) dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai kordinatnya (Y). persamaan tersebut digunakan untuk menentukan IC_{50} masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai Y sebesar 50 dan nilai X yang diperoleh sebagai IC_{50} .

Tabel 2. 1 Tingkat Kekuatan IC_{50} (Nasution et al., 2015)

<50 $\mu\text{g/mL}$	Sangat kuat
50-100 $\mu\text{g/mL}$	Kuat
101-150 $\mu\text{g/mL}$	Sedang
151-200 $\mu\text{g/mL}$	Lemah

2.5 Tinjauan Metode Ekstraksi

2.5.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi merupakan penyarian zat-zat berkhasiat atau aktif dari bagian tanaman, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik zat tertentu yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, di mana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian masuk ke dalam pelarut (Harbone, 1987; Dirjen POM, 1986).

2.5.2 Jenis-jenis Ekstraksi (Dirjen POM, 1986)

a. Soxhletasi

Metode ekstraksi ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya hingga zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon.

b. Perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan cara dibasahkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, menggunakan 2,5 bagian sampai 5 bagian cairan penyari dimasukkan dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam

perkolator, ditambahkan cairan penyari. Perkolator ditutup dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran dibuka dengan kecepatan 1 ml permenit, sehingga simplisia tetap terendam. Filtrat dipindahkan ke dalam bejana, ditutup dan dibiarkan selama 2 hari pada tempat terlindung dari cahaya.

c. Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan penyari 75 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu diperas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya, setelah dua hari lalu endapan dipisahkan.

d. Refluks

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut, demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam.

2.5.3 Pelarut

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair ataupun gas yang menghasilkan sebuah larutan. Pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi adalah aseton, etanol, metanol, etil asetat, kloroform, heksana, dan etilen diklorida. Pelarut dapat dibagi menjadi dua, yaitu pelarut polar dan pelarut non polar. Pelarut polar merupakan pelarut yang bersifat polar yang artinya dapat melarutkan senyawa-senyawa ion dan ovalen polar, seperti air, etanol, metanol, dan lain-lain. Sedangkan pelarut non polar adalah pelarut yang molekul-molekulnya bersifat non polar dan dapat melarutkan senyawa-senyawa ovalen non polar, seperti eter, benzen, bensin, CCl_4 , dan lain-lain.

Pada penelitian ini, digunakan zat metanol sebagai pelarutnya. Metanol merupakan pelarut universal yang memiliki gugus polar $-\text{OH}$ dan gugus nonpolar $-\text{CH}_3$ sehingga dapat menarik sebagian besar senyawa aktif yang terandung dalam tanaman baik yang bersifat polar maupun nonpolar (Astarina *et al.*, 2013). Pemilihan metanol sebagai pelarut dalam penelitian ini didasari pada hasil peneliitian Yuslinda *et al.* (2012), dimana esktrak metanol daun ubi kayu memiliki daya inhibisi terhadap radikal bebas DPPH paling tinggi dibandingkan estrak etanol dan estra n-heksan (Novita *et al.*, 2016).

2.6 Instrumen Spektrofotometer UV-VIS

2.6.1 Definisi Spektrofotometer UV-VIS

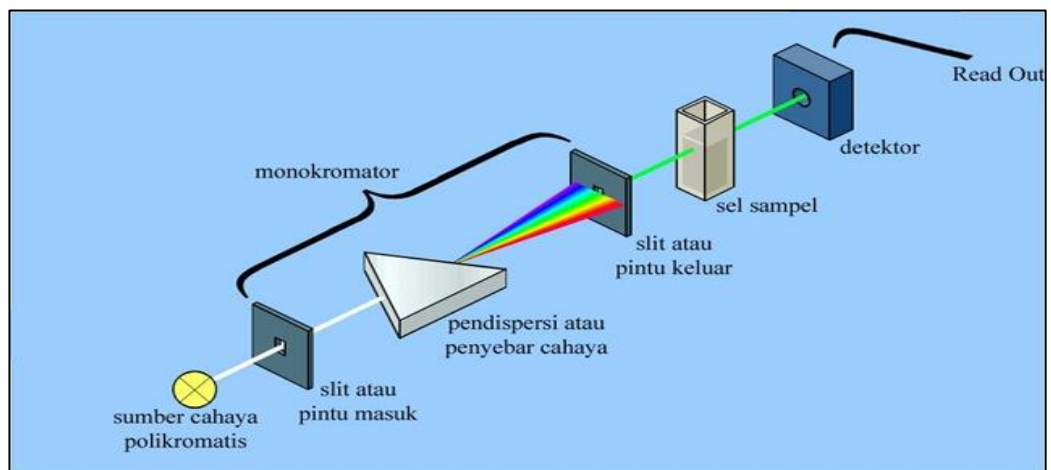
Spektrofotometri UV-VIS biasanya digunakan untuk menentukan zat organik dan anorganik secara kualitatif dan kuantitatif. Spektrofotometri UV-VIS juga telah banyak diterapkan untuk penetapan senyawa-senyawa organik yang umumnya dipergunakan untuk penentuan senyawa dalam jumlah kecil. Prinsip kerja dari spektrofotometri UV-VIS berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh suatu larutan. Jumlah cahaya atau energi yang diserap memungkinkan pengukuran jumlah zat penyerap dalam larutan secara kuantitatif. Cahaya adalah suatu bentuk energi radiasi yang mempunyai sifat sebagai gelombang dan partikel. Sifatnya sebagai gelombang dapat dilihat dengan terjadinya pembiasan dan pemantulan cahaya oleh suatu medium, sedangkan sifatnya sebagai partikel dapat dilihat dengan terjadinya efek foto listrik. Energi radiasi terdiri dari sejumlah besar gelombang elektromagnetik dengan panjang gelombang yang berbeda-beda. Cahaya Tampak hanyalah merupakan bagian kecil dari seluruh radiasi elektromagnetik. Spektrum cahaya Tampak terdiri dari komponen-komponen merah, jingga, kuning, hijau, biru dan ungu, dimana masing-masing warna mempunyai panjang gelombang yang berbeda (Triyati, 1985).

2.6.2 Jenis Spektrofotometer UV-VIS

Secara umum, spektrofotometer dapat dibagi dua tipe instrumen, yaitu *single-beam* dan *double-beam*.

a. *Single-beam instrument*

Single-beam instrument bisa digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Keuntungan dari *Single-beam instrument* yaitu sederhana, harga terjangkau, dan mengurangi biaya yang ada. Beberapa instrumen menghasilkan *single-beam instrument* untuk pengukuran sinar ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang paling rendah adalah 190 sampai 210 nm, sedangkan yang paling tinggi yaitu 800 sampai 1000 nm (Skoog, DA, 1996).

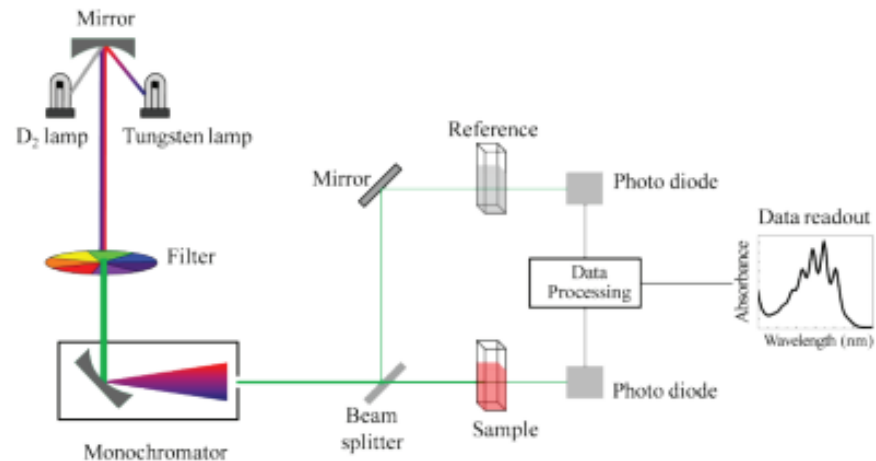


Gambar 2. 2 *single-beam instrument*

b. *Double-beam instrument*

Double-beam instrument digunakan pada panjang gelombang 190 sampai 750 nm. *Double-beam instrument* mempunyai dua sinar yang dibentuk oleh potongan cermin yang berbentuk V, disebut pemecah sinar. Sinar pertama melewati larutan blangko dan sinar kedua secara serentak melewati sampel, mencocokkan foto detektor yang keluar menjelaskan

perbandingan yang ditetapkan secara elektronik dan ditunjukkan oleh alat pembaca (Skoog, DA, 1996).



Gambar 2. 3 *double-beam instrument*

2.6.3 Bagian Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer UV-VIS memiliki 5 komponen utama, yaitu

a. Sumber radiasi

Sumber energi cahaya yang biasa untuk daerah tampak dari spektrum maupun daerah ultraviolet dekat dan inframerah dekat yaitu sebuah lampu pijar dengan kawat rambut yang terbuat dari wolfram atau bisa disebut lampu tungsten (wolfram). Lampu ini memiliki panjang gelombang 350 sampai 2200 nm.

b. Wadah sampel atau kuvet

Kuvet adalah wadah yang digunakan untuk menaruh sampel yang akan dianalisis. Kuvet terbuat dari kuarsa atau silika untuk radiasi UV dan gelas biasa atau kuarsa untuk radiasi sinar tampak. Tebal kuvet bervariasi, mulai dari 1 cm hingga 10 cm. Kuvet ditempatkan setelah monokromator

agar memungkinkan terjadinya dekomposisi oleh panjang gelombang berenergi tinggi yang masih ada di dalam radiasi polikromatis bisa diminimalkan. Posisi permukaan kuvet tegak lurus dengan datangnya radiasi sehingga kehilangan radiasi yang disebabkan pantulan dapat dikurangi.

c. Monokromator

Monokromator digunakan untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis yang berasal dari sinar polikromatis dengan komponen panjang gelombang tertentu. Komponen-komponen monokromator yaitu;

1. Celah untuk masuknya radiasi polikromatis dari sumber radiasi
2. Lensa/cermin untuk menyerap cahaya
3. Pendispersi cahaya yang berupa prisma atau grating yang dapat memecah radiasi menjadi komponen-komponen panjang gelombang.
4. Lensa/cermin pemfokus cahaya
5. Selah keluar

d. Detektor

Detektor menangkap sinar yang diteruskan oleh larutan. Sinar selanjutnya diubah menjadi sinyal listrik oleh amplifier dan dalam rekorder dan ditampilkan dalam bentuk angka-angka pada reader/komputer. Detektor bisa merespon terhadap radiasi pada berbagai panjang gelombang. Syarat detektor yaitu;

1. Sensitivitas tinggi sehingga daya radiasi yang kecil dapat terdeteksi.
2. Waktu respon yang singkat.

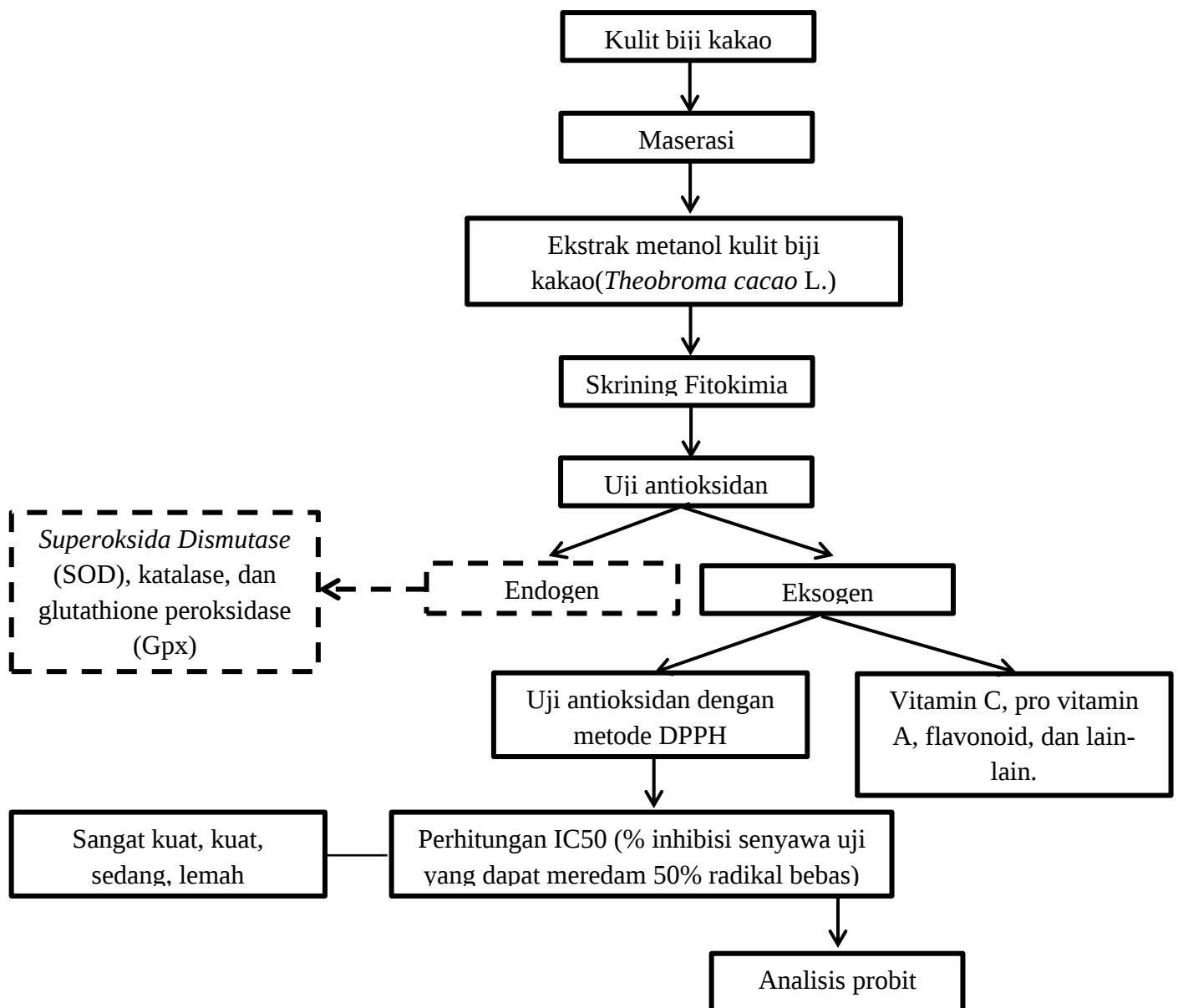
3. Stabil.
 4. Sinyal listrik yang dihasilkan harus sebanding dengan tenaga radiasi.
- e. Rekorder

Rekorder adalah sistem baca yang memperagakan besarnya isyarat listrik, menyatakan dalam bentuk % transmitan ataupun absorbansi

BAB 3

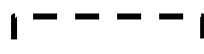
KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep

Keterangan :

 : Tidak teliti

 : Diteliti

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan penelitian eksperimen Laboratorium dengan menggunakan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl).

4.2 Populasi

Populasi pada penelitian ini menggunakan kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang didapat dari pusat penelitian kopi dan kakao, Jember, Jawa Timur

4.3 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini menggunakan ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.4 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dilakukan di laboratorium tanaman Politeknik Negeri Jember dengan membawa semua bagian tanaman untuk memastikan bahwa tanaman tersebut merupakan spesies tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.).

4. 5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini menggunakan ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh nilai IC₅₀.

4.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, metode pengujian aktivitas antioksidan, dan pelarut.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Laboratorium Kimia Farmasi dan Laboratorium Biologi Universitas dr. Soebandi mulai bulan Mei 2022.

4.7 Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Definisi Operasional

Variabel	Pengertian	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Sampel ekstrak metanol kulit biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut metanol dengan metode maserasi kemudian dilakukan pengenceran menggunakan metanol p.a	Ekstrak kental metanol kulit biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) yang ditimbang kemudian diukur % rendemen.	maserator	Skala rasio	% Rendemen
Aktivitas antioksidan	Hasil dari absorbansi pada sampel kulit biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) yang kemudian dihitung	Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara mengambil dari masing-masing larutan uji ekstrak	Spektrofotometer UV-VIS	Skala ordinal	IC ₅₀ dengan nilai kekuatan sangat kuat jika nilai IC ₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC ₅₀

	persen perendaman dan ditentukan konsentrasi penghambatan 50% (IC_{50})	dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm, kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH hingga homogen. Campuran selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu ruang sesuai dengan hasil optimasi waktu. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum			bernilai 50-100 ppm, sedang jika IC_{50} bernilai 100-150 ppm dan lemah jika IC_{50} bernilai 151-200 ppm (Mardawati <i>et al.</i>, 2008).
--	---	--	--	--	---

4.8 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

4.8.1 Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu destilator, spektrofotometer UV-VIS, blender, *water batch*, ultrasonik, timbangan analitik, toples maserasi, corong buchner, alat gelas, alumunium foil, gelas ekstrak, spatula, vial, kuvet disposable, mikropipet, blender, penyaring, cawan, desikator dan *stopwatch*.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari perkebunan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember, Provinsi JawaTimur, Indonesia., metanol, aquadest, senyawa DPPH dan kuersetin.

4.8.2 Teknik Pengambilan Data

a. Pembuatan simplisia kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang sudah dikeringkan, selanjutnya digiling hingga terbentuk serbuk (Kayaputri *et al.*, 2014).

b. Pembuatan ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

Serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi. Serbuk ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan ke dalam wadah, kemudian ditambahkan dan direndam dengan pelarut metanol sebanyak 1500 mL, sehingga rasio antara sampel dan pelarut adalah 1:3, kemudian dimaserasi selama 5x 24 jam pada suhu ruang dalam keadaan tertutup dan terhindar dari cahaya matahari langsung. Filtrat dipisahkan dari residunya menggunakan alat *water batch* pada suhu 60 °C.

c. Skrining fitokimia

1. Uji alkaloid

Ekstrak ditambahkan beberapa mL larutan asam klorida kemudian disaring. Filtrat selanjutnya ditambah 1-2 mL pereaksi Dragendorff. Terbentuknya endapan warna kuning menyala menunjukan adanya senyawa alkaloid (Kayaputri *et al.*, 2014).

2. Uji flavonoid

Ekstrak ditambahkan 8-10 tetes asam klorida dan sedikit serbuk magnesium, selanjutnya dipanaskan selama 10-15 menit dan didinginkan. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya kadar flavonoid (Kayaputri *et al.*, 2014).

3. Uji saponin

Ekstrak dilarutkan dengan 10 mL air panas dalam tabung reaksi, kemudian didinginkan dan kocok kuat-kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih yang mantap selama kurang lebih 10 menit, setinggi 1-10 cm. Buih tidak akan hilang jika ditambahkan satu tetes asam klorida (Kayaputri *et al.*, 2014).

4. Uji triterpenoid

Ekstrak ditambahkan 2 mL asam asetat anhidrat, selanjutnya ditambahkan 2 mL asam sulfat. Terbentuknya lapisan coklat pada dua lapisan, lapisan atas berwarna hijau menunjukkan adanya steroid dan lapisan bawah berwarna merah tua menunjukkan adanya triterpenoid (Kayaputri *et al.*, 2014).

5. Uji tanin

Ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 1 mg ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 , adanya tannin akan ditandai dengan berubahnya warna hijau, biru sampai hitam (Nurrosyidah *et al.*, 2019).

d. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

1. Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH 50 ppm dibuat dengan melarutkan padatan DPPH sebanyak 5 mg ke dalam 100 mL metanol p.a (Tristantini *et al.*, 2016).

2. Pembuatan larutan uji ekstrak

Ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg, selanjutnya dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a dan dimasukkan ke dalam labu ukur sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm. Dari larutan induk tersebut dibuat seri konsentrasi menjadi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm (Handayani *et al.*, 2020).

3. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Larutan stok pembanding dibuat dengan 200 ppm yaitu dengan cara serbuk kuersetin ditimbang 2 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga homogen dalam labu ukur 10 mL dan cukupkan volumenya. Dibuat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm (Handayani *et al.*, 2020).

4. Penentuan panjang gelombang

Larutan stok DPPH dengan konsentrasi 50 ppm diambil sebanyak 4 mL. Selanjutnya dilakukan pengukuran Panjang gelombang maksimal

dengan mengukur absorbansi larutan DPPH pada spektrofotometer pada panjang gelombang 500-525 nm (Handayani *et al.*, 2020).

5. Penentuan waktu inkubasi optimum

Penentuan optimasi waktu inkubasi bertujuan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan suatu zat untuk bereaksi secara optimum sehingga menghasilkan serapan yang stabil (Saptari H *et al.*, 2019). Larutan DPPH dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL yang seluruh bagiannya sudah ditutup menggunakan alumunium foil, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan dihomogenkan. Sampel diukur dan diamati pada panjang gelombang maksimum tiap 10, 20, 30 ,40, 50 dan 60 menit, dan ditentukan waktu optimum (Nuraeni & Br Sembiring, 2019).

6. Pengukuran aktivitas antioksidan larutan uji ekstrak metanol kulit biji kakao dan larutan kuersetin

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara dipipet 0,5 mL dari masing-masing larutan uji ekstrak dengan konsentrasi (50, 100, 150, 200 dan 250 ppm) dan larutan kuersetin dengan konsentrasi (10, 20, 30, 40 dan 50 ppm), selanjutnya ditambahkan larutan DPPH sebanyak 3,5 mL hingga homogen. Campuran tersebut selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu ruang sesuai dengan hasil optimasi waktu. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum (Handayani *et al.*, 2014).

7. Perhitungan nilai IC₅₀

Nilai persentase hambatan terhadap DPPH dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel mengikuti rumus di atas. Selanjutnya didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan melakukan perhitungan secara regresi linier menggunakan rumus ($y = bx + a$), kemudian dilakukan perhitungan untuk mencari nilai IC₅₀ menggunakan metode probit.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao

(*Theobroma cacao* L.)

5.1.1 Hasil Determenasi Tanaman

Determinasi dilakukan di UPT (Pengembangan Pertanian Terpadu) Politeknik Negeri Jember. Hasil dari determinasi menunjukkan apabila kulit biji kakao yang digunakan dalam penelitian dapat dipastikan bahwa tanaman yang diteliti adalah spesies *Theobroma cacao* L. yang tergolong dalam suku *Sterculiaceae*. Hasil determinasi kulit biji kakao dapat dilihat pada Lampiran 1.

5.1.2 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang dihasilkan berupa ekstrak kental sebanyak 59,42 gram dari 500 gram serbuk simplisia kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan diperoleh rendemen 11,84%. Hasil rendemen dapat dilihat pada table 5.1.

Tabel 5. 1 Hasil Ekstrak Kulit Biji Kakao

Simplisia	Ekstrak Kental	Rendemen
500 gram	59,42 gram	11,84%

5.1.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis metabolit sekunder apa yang terkandung pada sampe dan juga untuk memperkirakan senyawa apa yang memiliki aktivitas antioksidan. Berdasarkan data yang diperoleh, kulit biji kakao memiliki golongan senyawa alkaloid, triterpenoid, flavonoid, saponin dan tannin. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada table 5.2 dan Lampiran 4.

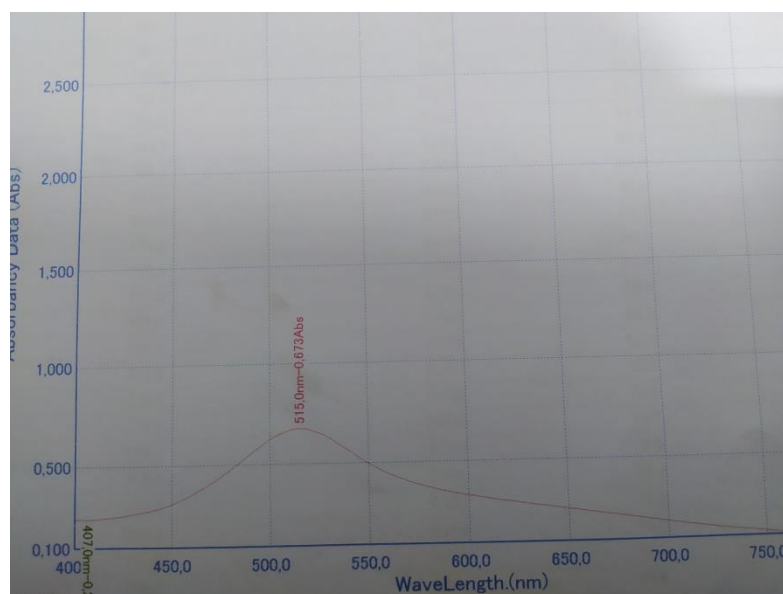
Tabel 5. 2 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao

Senyawa	Hasil
Alkaloid	+
Triterpenoid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Tanin	+

5.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan

5.5.1 Optimasi Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang DPPH menggunakan instrument spektrofotometer UV-Vis. Serapan maksimum diperoleh hasil 0,673 pada panjang gelombang 515,0 nm (dapat dilihat pada gambar 5.1).



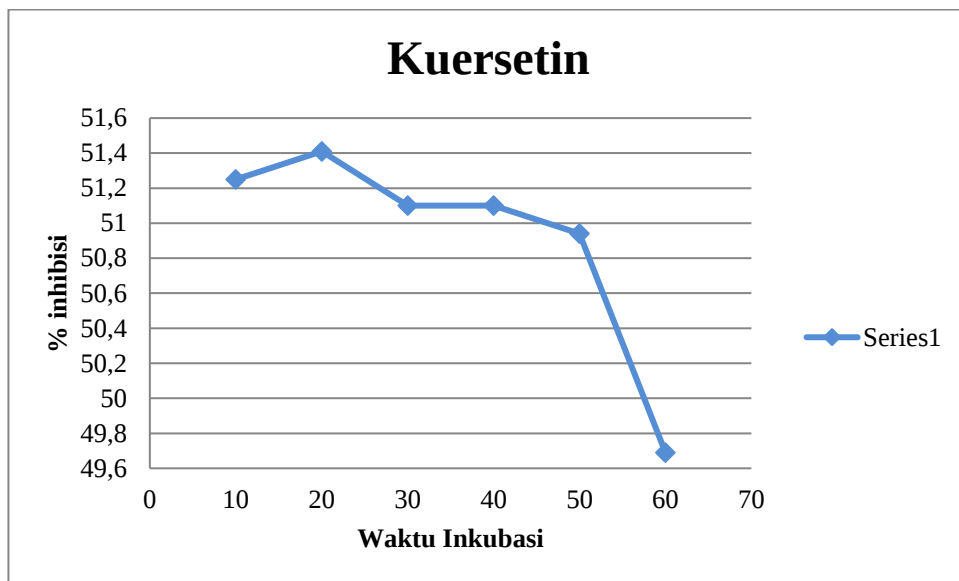
Gambar 5. 1 Kurva Panjang Gelombang DPPH

5.2.2 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

Hasil dari uji optimasi waktu inkubasi diperoleh waktu terbaik pada menit 40 dengan cara melihat nilai R^2 yang mendekati 1 dan nilai IC_{50} yang paling rendah. Grafik linier optimasi waktu inkubasi kuersetin terbaik dan hasil optimasi waktu inkubasi kuersetin dapat dilihat pada gambar 5.2 dan tabel 5.3.

Tabel 5. 3 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin			
Waktu Inkubasi	Konsentrasi	Abs	% Inhibisi
Blangko		0.638	
10 menit	10	0.311	51.25
20 menit	10	0.313	51.41
30 menit	10	0.312	51.1
40 menit	10	0.31	51.1
50 menit	10	0.313	50.94
60 menit	10	0.321	49.69



Gambar 5. 2 Grafik Linier Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

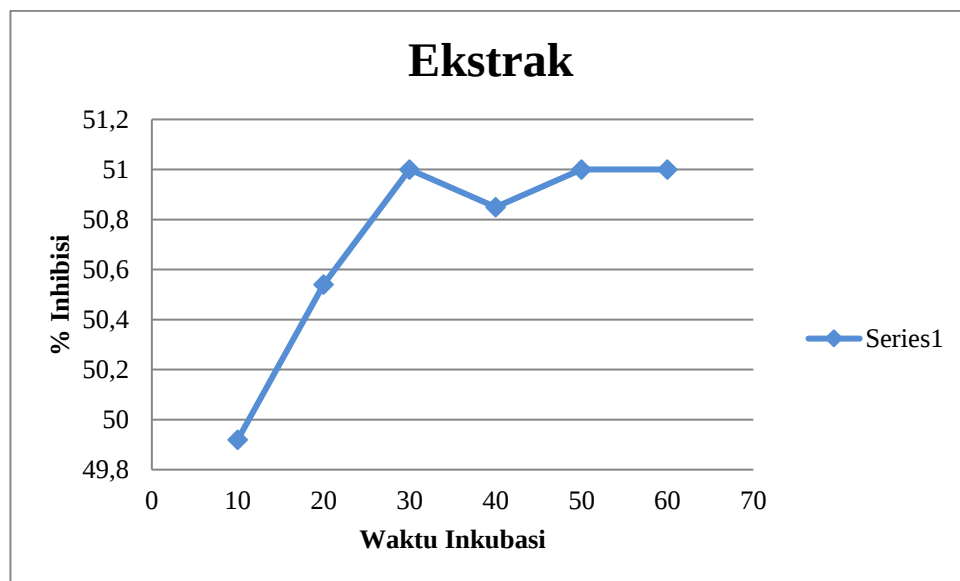
5.2.3 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao

(*Theobroma cacao* L.)

Hasil uji optimasi waktu inkubasi ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diperoleh waktu terbaik pada menit 40 dengan cara melihat nilai R^2 yang mendekati 1 dan nilai IC_{50} yang paling rendah. Grafik linier optimasi waktu inkubasi ekstrak terbaik dan hasil optimasi waktu inkubasi ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat dilihat pada gambar 5.3 dan tabel 5.4.

Tabel 5. 4 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao

Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak			
Waktu Inkubasi	Konsentrasi	Abs	% Inhibisi
Blangko		0.638	
10	100	0.323	49.92
20	100	0.319	50.54
30	100	0.316	51
40	100	0.317	50.85
50	100	0.316	51
60	100	0.316	51



Gambar 5. 3 Grafik Linier Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak

5.2.4 Pengukuran Absorbansi Kuersetin dan Ekstrak Metanol Kulit Biji

Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Pengujian kuersetin dilakukan inkubasi selama 40 menit dan ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) selama 40 menit diukur pada panjang gelombang 515 nm sesuai dengan optimasi yang sudah dilakukan. Hasil pengujian dihitung untuk mencari %inhibisi dan nilai probit. Hasil absorbansi kuersetin dan ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat dilihat pada table 5.5 dan 5.6

Tabel 5. 5 Hasil Absorbansi Pengujian Kuersetin

Kuersetin					
REPLIKASI	KONSENTRASI	LOG KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI	PROBIT
BLANGKO			0.638		
Replikasi 1	0.63 ppm	-0.20	0.357	44.04	4.85
	2.5 ppm	0.40	0.332	47.96	4.95
	5.63 ppm	0.75	0.320	49.84	5.00
	10 ppm	1.00	0.313	50.94	5.03
	15.63 ppm	1.19	0.302	52.66	5.08
Replikasi 2	0.63 ppm	-0.20	0.353	44.67	4.87
	2.5 ppm	0.40	0.323	49.37	4.97
	5.63 ppm	0.75	0.317	50.31	5.00
	10 ppm	1.00	0.312	51.10	5.03
	15.63 ppm	1.19	0.304	52.35	5.05
Replikasi 3	0.63 ppm	-0.20	0.356	44.20	4.87
	2.5 ppm	0.40	0.328	48.59	4.97
	5.63 ppm	0.75	0.319	50.00	5.00
	10 ppm	1.00	0.307	51.88	5.05
	15.63 ppm	1.19	0.306	52.04	5.05

Tabel 5. 6 Hasil Absorbansi Pengujian Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao

Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao					
REPLIKASI	KONSENTRASI	LOG KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI	PROBIT
BLANGKO			0.640		
Replikasi 1	6.25 ppm	0.80	0.325	49.21	4.97
	25 ppm	1.40	0.320	50.00	5.00
	56.25 ppm	1.75	0.316	50.62	5.03
	100 ppm	2.00	0.311	51.41	5.03
	156.25 ppm	2.19	0.305	52.34	5.05
Replikasi 2	6.25 ppm	0.80	0.326	49.06	4.97
	25 ppm	1.40	0.319	50.16	5.00
	56.25 ppm	1.75	0.314	50.94	5.03
	100 ppm	2.00	0.310	51.56	5.05
	156.25 ppm	2.19	0.306	52.19	5.05
Replikasi 3	6.25 ppm	0.80	0.326	49.06	4.97
	25 ppm	1.40	0.321	49.84	5.00
	56.25 ppm	1.75	0.315	50.78	5.03
	100 ppm	2.00	0.311	51.41	5.03
	156.25 ppm	2.19	0.304	52.5	5.05

5.2.5 Hasil Analisis Nilai IC₅₀ Kuersetin dan Ekstrak Kulit Biji Kakao

Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan sampel dihitung sebagai %inhibisi dan probit. Hasil perhitungan probit dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan log konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai probit sebagai ordinatnya (sumbu Y). Hasil analisis nilai IC₅₀ ekstrak dan kuersetin dapat dilihat pada table 5.7 dan persamaan regresi linier dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 5. 7 Hasil Nilai IC₅₀ Kuersetin dan Ekstrak Kulit Biji Kakao

Senyawa	IC ₅₀ (replikasi)			$\bar{X} \pm SD$	Kategori
	1	2	3		
Kuersetin	5.52	5.70	5.35	5.52 $\pm$ 0.18	Sangat Kuat
Ekstrak	21.96	20.18	21.96	21.37 $\pm$ 1.03	Sangat Kuat

Berdasarkan hasil nilai pengujian ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan 3 kali replikasi menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) masuk dalam kategori sangat kuat dengan hasil nilai rata-rata IC₅₀ yaitu 21.37 $\pm$ 1.03 μ g/mL, sedangkan nilai rata-rata IC₅₀ kuersetin yaitu 5.52 $\pm$ 0.18 μ g/mL dan termasuk dalam kategori sangat kuat. Hasil RSD (*Relative Standard Deviation*) ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yaitu 4,82 %, sedangkan RSD kuersetin yaitu 3,16 %.

BAB 6

PEMBAHASAN PENELITIAN

6.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Biji Cacao

(*Theobroma cacao* L.)

6.1.1 Ekstrak Kulit Biji Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang didapatkan dari Pusat Penelitian Kopi dan Coklat Jember. Serbuk kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 500 gram dilakukan ekstraksi dengan pelarut metanol 1,5 liter. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana yaitu dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut (Lathifa, 2008). Metode maserasi tidak menggunakan suhu tinggi sehingga tidak berpotensi merusak zat aktif dalam sampel yang tidak tahan terhadap suhu tinggi (Prasetya, Putra dan Wrsiati, 2020). Sampel dimaserasi selama 5x 24 jam. Semakin lama waktu maserasi, menyebabkan kontak sampel dengan pelarut semakin lama, sehingga mengakibatkan dinding sel pada bahan pecah dan mengeluarkan zat terlarut ke dalam pelarut semakin banyak sehingga hasilnya akan bertambah sampai titik optimum dari pelarut (Prasetya, Putra dan Wrsiati, 2020).

Ekstrak kental kulit biji kakao yang dihasilkan sebanyak 59,42 gram dari 500 gram simplisia kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dan rendemen yang dihasilkan yaitu 11,84%. Pada penelitian Utami *et al.* (2017) didapatkan hasil rendemen dengan nilai paling rendah yaitu pada penyangraian derajat berat yaitu dengan nilai 8,07 %. Rendemen adalah perbandingan produk akhir yang dihasilkan terhadap bahan baku yang digunakan. Nilai rendemen yang diperoleh berdasarkan berat kering bahan baku (Kiswandono, 2017).

6.1.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Skrining fitokimia adalah tahap awal untuk mengidentifikasi kandungan suatu senyawa dalam simplisia atau sampel yang akan diuji. Fitokimia atau kimia tumbuhan mempelajari bermacam senyawa organik yang dibentuk atau ditimbun oleh tumbuhan itu sendiri, yaitu mengenai struktur kimianya, biosintesisnya, penyebarannya secara ilmiah serta biologisnya (Dewatisari, Rumiyaniti dan Rakhmawati, 2018). Senyawa-senyawa kimia yang merupakan hasil metabolisme sekunder pada tumbuhan sangat beragam dan dapat diklasifikasikan dalam beberapa golongan senyawa bahan alam yaitu saponin, steroid, tannin, flavonoid dan alkaloid (putranti *et al.*, 2013). Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif berdasarkan pada sifat kelarutan senyawa (Dewatisari, Rumiyaniti dan Rakhmawati, 2018). Hasil analisis senyawa fitokimia diperoleh beberapa senyawa fitokimia yang terkandung pada ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Jenis senyawa tersebut adalah senyawa golongan alkaloid, triterpenoid, flavonoid, saponin dan tannin. Hasil skrining yang sama juga ditunjukkan oleh

penelitian Kayaputri *et al.* (2014) tentang kajian fitokimia ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan pelarut etanol.

a. Alkaloid

Hasil pengujian alkaloid menunjukkan adanya kandungan alkaloid pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Terbentuknya endapan dan perubahan warna saat penambahan reagen Dragendorff menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak. Reagen Dragendorff mengandung logam-logam bismut nitrat dan kalium iodida. Ion logam K⁺ dari reagen Dragendorff akan membentuk ikatan dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kaliumalkaloid berwarna cokelat muda sampai kuning yang mengendap (Marliana *et al.*, 2005).

b. Triterpenoid

Triterpenoid merupakan salah satu golongan terpenoid yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena, berbentuk kristal, tanpa warna dan tidak bersifat volatil. Hasil pengujian triterpenoid menunjukkan adanya kandungan triterpenoid pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Perubahan warna ke merah tua menunjukkan adanya triterpenoid (Kayaputri *et al.*, 2014).

c. Flavonoid

Hasil pengujian flavonoid menunjukkan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Terbentuknya warna merah bata setelah sampel direaksikan dengan asam klorida dan serbuk magnesium menunjukkan keberadaan flavonoid. Manfaat flavonoid bagi

tubuh manusia yaitu sebagai antibiotik dan antioksidan serta dapat menghambat pendarahan (Susilawati, 2007). Flavonoid dapat beraksi sebagai antioksidan dengan menangkap radikal bebas melalui pemberian atom hidrogen pada radikal tersebut. Secara umum, kemampuan flavonoid dalam menangkap radikal tergantung dari substitusi gugus hidroksi dan kemampuan stabilisasi dari radikal bebas melalui ikatan hidrogen atau melalui delokalisasi elektron. Selanjutnya radikal fenoksi flavonoid tersebut distabilkan oleh delokalisasi elektron yang tidak berpasangan di sekitar cincin aromatik. Stabilitas radikal fenoksi flavonoid (*reactive oxygen*) akan mengurangi kecepatan perambatan (propagasi) autooksidasi reaksi berantai (Amin, Wunas dan Anin, 2013).

d. Saponin

Hasil pengujian saponin menunjukkan adanya kandungan saponin pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Terbentuknya busa saat ekstrak dikocok bersama air di dalam tabung reaksi menunjukkan keberadaan saponin. Kemampuan saponin membentuk busa karena kombinasi sapogenin hidrofobik dan bagian gula hidrofilik (Kayaputri *et al.*, 2014).

e. Tanin

Hasil pengujian tannin menunjukkan adanya kandungan tannin pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Perubahan warna ke biru kehitaman menunjukkan adanya kandungan tannin. Tannin berfungsi sebagai antibakteri dan antimikroba terhadap kapang dan khamir serta

dapat digunakan sebagai antioksidan pada lemak dan minyak, zat pewarna dan antidiare (Susilawati, 2007).

6.2 Analisis Nilai Inhibisi Konsentrasi 50% (IC_{50})

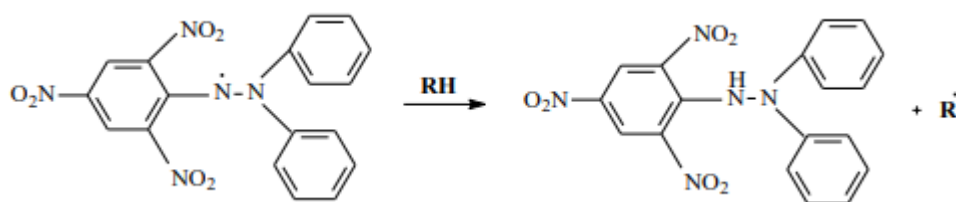
Uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode DPPH. Pemilihan metode ini karena metode DPPH merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat serta hanya memerlukan sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan (Yahya dan Nurrosyidah, 2020). Metode DPPH adalah metode untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam sampel dengan melihat kemampuannya dalam menangkal radikal bebas senyawa DPPH (Amin, Wunas dan Anin, 2013). Pengujian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam mereduksi radikal bebas DPPH yang dapat dilihat dari nilai IC_{50} yang diperoleh. Prinsip dari metode uji aktivitas antioksidan ini adalah pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif yaitu dengan melakukan pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga dengan demikian akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC_{50} didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi. Prinsip kerja dari pengukuran ini adalah adanya radikal bebas stabil yaitu DPPH yang dicampurkan dengan senyawa antioksidan

yang memiliki kemampuan mendonorkan hidrogen, sehingga radikal bebas dapat diredam (Al Ridho, Sari dan Wahdaningsih, 2013)

Sebelum melakukan uji aktivitas antioksidan, dilakukan penentuan panjang gelombang maksimal terlebih dahulu. Larutan DPPH digunakan sebagai blanko pada penentuan panjang gelombang. Larutan DPPH yang diambil dari larutan induk dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur pada panjang gelombang 500-530 nm untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0,2-0,8$ (Najihudin *et al.*, 2017). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH yaitu λ_{max} 515 nm dengan absorbansi 0,673. Panjang gelombang yang diperoleh sesuai dengan penelitian Retnaningtyas *et al.* (2017) dan Thaipong *et al.* (2006) yaitu 515 nm.

Penentuan optimasi waktu inkubasi bertujuan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan suatu zat untuk bereaksi secara optimum sehingga menghasilkan serapan yang stabil (Saptari H *et al.*, 2019). Penentuan optimasi waktu inkubasi diukur pada panjang gelombang 515 nm selama 60 menit dengan selang waktu 10 menit. Hasil penentuan optimasi waktu inkubasi yaitu pada menit 40 untuk ekstrak dan menit 40 untuk kuersetin. Pada penelitian yang lain tentang uji aktivitas antioksidan kombinasi daun kopi arabika dan daun pandan menyatakan bahwa waktu yang optimum untuk berlangsungnya reaksi secara sempurna yaitu 30 menit. Perbedaan hasil optimasi waktu inkubasi yang berbeda diduga karena sampel yang bervariasi sesuai dengan karakteristik yang ada pada sampel terutama karakteristik aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh sampel (Retnaningtyas, Hamzah dan Kristiningrum, 2017).

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mereaksikan sampel ekstrak dengan larutan DPPH dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 515 nm. DPPH yang merupakan suatu molekul radikal bebas dengan warna ungu dapat berubah menjadi senyawa yang stabil dengan warna kuning oleh reaksi dengan antioksidan, dimana antioksidan memberikan satu elektronnya pada DPPH sehingga terjadi peredaman pada radikal bebas DPPH. Peredaman radikal bebas oleh antioksidan terjadi ketika elektron tidak berpasangan menjadi berpasangan dengan adanya donor hidrogen, sehingga membentuk DPPH yang stabil (Yuhernita dan Juniarti, 2011).

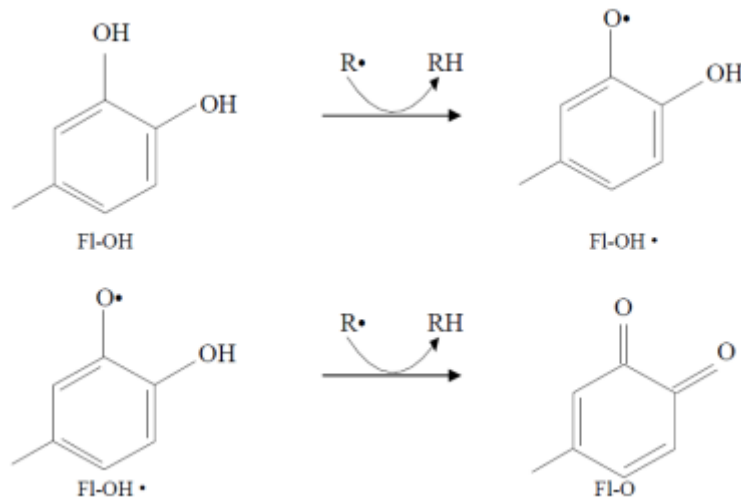


Gambar 6. 1 Mekanisme DPPH Akseptor (Yuhernita & Juniarti, 2011)

Data absorbansi yang dihasilkan kemudian digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) didapat dari hasil perhitungan analisis probit. Nilai IC_{50} ekstrak yang diperoleh yaitu Rep1= 21.96 $\mu\text{g/mL}$, Rep2= 20.18 $\mu\text{g/mL}$ dan Rep3= 21.96 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai rata-rata yaitu $21.37 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ termasuk dalam kategori sangat kuat. Penelitian yang dilakukan oleh (Utami *et al.*, 2017) dengan penelitian aktivitas antioksidan ekstrak polifenol kulit biji kakao dengan metode DPPH menunjukkan penyangraian derajat sedang memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH tertinggi, yang

dinyatakan dengan IC_{50} yaitu 74,31 $\mu\text{g/mL}$ dan termasuk dalam kategori kuat. Pada penelitian Prasetya, Putra dan Wrasati (2020) tentang pengaruh jenis pelarut dan waktu maserasi terhadap ekstrak kulit biji kakao menunjukkan perlakuan terbaik untuk menghasilkan ekstrak kulit biji kakao sebagai sumber antioksidan adalah menggunakan pelarut etanol dan waktu maserasi selama 48 jam yaitu dengan nilai 49,55 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan hasil diduga karena jenis pelarut dan waktu maserasi sangat berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) (Prasetya, Putra dan Wrasati, 2020).

Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) tergolong antioksidan yang kuat, diduga karena dalam hasil skrining fitokimia terdapat senyawa flavonoid dalam ekstrak. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena mampu mentransfer sebuah elektron kepada senyawa radikal bebas, dimana $R\cdot$ merupakan senyawa radikal bebas, $Fl-OH$ merupakan senyawa flavonoid sedangkan $Fl-OH\cdot$ merupakan radikal flavonoid (Al Ridho, Sari dan Wahdaningsih, 2013).



Gambar 6. 2 Mekanisme Peredaman Radikal Bebas oleh Flavonoid (Kandaswami & Midelton, 1997).

Pada penelitian ini digunakan kuersetin sebagai pembanding untuk mengetahui bahwa metode yang digunakan sudah benar. Kuersetin digunakan sebagai pembanding karena merupakan golongan flavonoid yang sering ditemukan dalam tumbuhan dan diketahui memiliki banyak aktivitas biologis, khususnya antioksidan (Handayani, Najib dan Wati, 2018). Kuersetin pada penelitian ini memiliki aktivitas antioksidan yang termasuk dalam kategori sangat kuat yaitu dengan nilai rata-rata $5.52 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$. Hasil analisis ini menunjukkan aktivitas antioksidan kuersetin lebih kuat dibanding aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan :

1. Kandungan kimia yang dihasilkan dari uji skrining fitokimia ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yaitu alkaloid, triterpenoid, flavonoid, saponin dan tannin.
2. Ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki aktivitas antioksidan karena memiliki kandungan senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai zat antoksidan.
3. Nilai IC_{50} dari ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yaitu sebesar $21.37 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ dan termasuk kategori sangat kuat, sedangkan nilai IC_{50} kuersetin yaitu $5.52 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ dan termasuk kategori sangat kuat.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode yang lain untuk memperkuat hasil uji aktivitas antioksidan pada kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.), seperti menggunakan metode ekstraksi yang lain seperti sokhletasi, fraksinasi, perkolasi dan lain-lain, serta bisa juga

digunakan metode uji aktivitas antioksidan yang lain seperti ABTS dan FRAP.

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengambil sampel kulit biji di tempat lain untuk mengetahui senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.).
3. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan sampel tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) pada bagian lain seperti daun, batang dan akar untuk memperkuat uji aktivitas antioksidannya.

DAFTAR PUSTAKA

- A, Jusmiati; Rusli, Rolan; Rijai, L. (2019) 'AKTIVITAS ANTIOKSIDAN KULIT BUAH KAKAO MASAK DAN KULIT BUAH KAKO MUDA', *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1(2), pp. 34–39.
- Al Ridho, E., Sari, R. and Wahdaningsih, S. (2013) 'UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL BUAH LAUKM DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)', 1, pp. 81–109.
- Amin, A., Wunas, J. and Anin, Y.M. (2013) 'UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL KLIKA FALOK (Sterculia quadrifida R . Br) DENGAN METODE DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)', *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 2(2), pp. 111–114.
- Andarina, R. and Djauhari, T. (2017) 'Antioksidan dalam Dermatologi', *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 4(1), pp. 39–48.
- Budi, M. (2020) 'Karakteristik Moroflogi dan Kegiatan Plasma Nutfah Tanaman Kakao', *BALAI PENELITIAN TANAMAN INDUSTRI DAN PENYEGAR*, pp. 15–28.
- Dewatisari, W.F., Rumiyan, L. and Rakhmawati, I. (2018) 'Rendemen dan Skrining Fitokimia pada Ekstrak Daun Sansevieria sp.', *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 17(3), p. 197. Available at:

<https://doi.org/10.25181/jppt.v17i3.336>.

Diantika, Fitrah; Sutan, Sandra Malin; Yulianingsih, R. (2014) 'Effect of Long Extraction and Concentration and Concentration of Ethanol Solvent Extraction Antioxidant Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.)', *Jurnal Teknologi Pertanian*, 15(3), pp. 159–165. Available at: <https://doi.org/10.21776/ub.jtp.2014.015.03.02>.

Dirjen POM (1986) 'Metode Ekstraksi', *Tetrahedron Letters* [Preprint].

Handayani, S., Kurniawati, I. and Abdul Rasyid, F. (2020) 'Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Karet Kebo (*Ficus Elastica*) dengan Metode Peredaman Radikal Bebas Dpph (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazil)', *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 6(1), pp. 141–150. Available at: <https://doi.org/10.22487/j24428744.2020.v6.i1.15022>.

Handayani, S., Najib, A. and Wati, N.P. (2018) 'UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN DARUJU (*Acanthus ilicifolius* L.) DENGAN METODE PEREDAMAN RADIKAL BEBAS 1,1-DIPHENYIL-2-PICRYLHIDRAZIL (DPPH)', *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 5(2), pp. 299–308. Available at: <https://doi.org/10.33096/jffi.v5i2.414>.

Handayani, V., Ahmad, A.R. and Sudir, M. (2014) 'Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (*Etlingera elatior* (Jack) R . M . Sm) Menggunakan Abstrak', *Pharm Sci Res*, 1(2), pp.

86–93.

Jean-Marie, E. *et al.* (2021) ‘Antioxidative and immunomodulatory potential of the endemic french guiana wild cocoa “guiana”’, *Foods*, 10(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods10030522>.

Kayaputri, I.L. *et al.* (2014) ‘KAJIAN FITOKIMIA EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)’, *Chimica et Natura Acta*, 2(1), pp. 83–90.

Kiswandono, A.A. (2017) ‘SKRINING SENYAWA KIMIA DAN PENGARUH METODE MASERASI DAN REFLUKS PADA BIJI KELOR (*Moringa oleifera*, Lamk) TERHADAP RENDEMEN EKSTRAK YANG DIHASILKAN’, *Jurnal Sains Natural*, 1(2), p. 126. Available at: <https://doi.org/10.31938/jsn.v1i2.21>.

Lathifa QA. 2008. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri Pada Buah Belimbing (*Averrhoa Bilimbi* L.) Dengan Variasi Pelarut. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Malik Ibrahim. Malang.

Marliana, S.D., Suryanti, V. & Suyono, (2005). Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis komponen kimia buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam ekstrak etanol. *Biofarmasi*, 3(1), 26-31.

Najihudin, Aji; Chaerunissa, Anis; Subarnas, A. (2017) ‘AKTIVITAS

ANTIOKSIDAN EKSTRAK dan FRAKSI KULIT BATANG TRENGGULI (' , *Ijpest*, 4(2), pp. 70–78.

Nasution, P.A., Batubara, R. and Surjanto (2015) 'Tingkat Kekuatan Antioksidan dan Kesukaan Masyarakat Terhadap Teh Daun Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) Berdasarkan Pohon Induksi dan Non-Induksi', *Peronema - Forest Science Journal.*, 4(1), pp. 10–18.

Novita, M., Sulaiman, M.I. and Yura, S. (2016) 'Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Fenol Beberapa Jenis Bayam dan Sayuran Lain (Effect of Solvent Extraction on Antioxidant Activity and Phenolic Content of Variety of Amaranth and Other Vegetables)', *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian Unsyiah*, 1(1), pp. 935–940. Available at: www.jim.unsyiah.ac.id/JFP.

Nuraeni, F. and Br Sembiring, S.B. (2019) 'AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI SENYAWA EKSTRAK JAMUR LINGZHI (*Ganoderma lucidum*) DENGAN LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (LC-MS)', *Ekologia*, 19(2), pp. 65–72. Available at: <https://doi.org/10.33751/ekol.v19i2.1647>.

Nurrosyidah, I.H., Hermawati, R. and Asri, M. (2019) 'UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SEDIAAN GEL EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centela asiatica* L.) TERHADAP BAKTERI

- Staphylococcus aureus SECARA IN VITRO’, *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*, 2(1), pp. 45–57. Available at: <https://doi.org/10.36932/j-pham.v2i1.8>.
- Prasetya, I.W.G.A., Putra, G. and Wrasianti, L.P. (2020) ‘Pengaruh Jenis Pelarut dan Waktu Maserasi terhadap Ekstra Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Sumber Antioksidan’, *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 8(1), pp. 150–159. Available at: <https://doi.org/10.24843/jrma.2020.v08.i02.p02>.
- Putranti, Ristyana Ika. 2013. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum duplicatum* dan *Turbinaria ornata* dari Jepara. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Retnaningtyas, Y., Hamzah, M.H. and Kristiningrum, N. (2017) ‘Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Daun Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dan Daun Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) dengan Metode DPPH’, *Jurnal Farmasi Indonesia*, 9(1), pp. 26–32. Available at: <https://doi.org/10.35617/jfi.v9i1.565>.
- Rorong, J.A. (2008) ‘UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI DAUN CENGKEH (*Eugenia Carryophyllus*) DENGAN METODE DPPH’, *Chemistry Progress*, 1(2), pp. 111–116. Available at: <https://doi.org/10.35799/cp.1.2.2008.4961>.
- Saptari H, T. *et al.* (2019) ‘KADAR FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL RUMPUT LAUT

- COKLAT (*Padina australis*)', *Fitofarmaka*, 9(1), pp. 1–8.
- Susilawati, Y. (2007). Flavonoid Tanin-Polifenol. Universitas Padjadjaran, Jatinangor-Indonesia.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros- Zevallos, L. & Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(6-7): 669-675.
- Tristantini, D. *et al.* (2016) 'Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L)', *Universitas Indonesia*, pp. 1–7.
- Triyati, E. (1985) 'SPEKTROFOTOMETER ULTRA-VIOLET DAN SINAR TAMPAK SERTA APLIKASINYA DALAM OSEANOLOGI', *Oseana*, X(1), pp. 39–47.
- Utami, R.R. *et al.* (2017) 'Aktivitas Antioksidan Kulit Biji Kakao dari Hasil Penyangraian Biji Kakao Kering pada Derajat Ringan, Sedang dan Berat', *Agritech*, 37(1), p. 89. Available at: <https://doi.org/10.22146/agritech.10454>.
- Yahya, M.A. and Nurrosyidah, I.H. (2020) 'AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica* (L .) Urban) DENGAN METODE DPPH', *Journal of Halal Product and Research (JHPR)*, 3(2), pp. 106–112. Available at:

<https://doi.org/10.20473/jhpr.vol.3-issue.2.106-112>.

Yuhernita & Juniarti. (2011). Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang berpotensi Sebagai Antioksidan. Makara Sains, 15(1), 48 – 52.

Lampiran 1 Hasil Determinasi Tumbuhan

Kode Dokumen : FR-AUK-064
 Revisi : 0



**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>

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/1/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Jeffrica 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. Dudi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM
 NIP. 197106212001121001

Lampiran 2 Proses Pembuatan Ekstrak

Perendaman serbuk simplisia kulit
biji kakao



Penyaringan



Penguapan ekstrak



Ekstrak kental kulit biji kakao



Lampiran 3 Perhitungan Rendemen

Perhitungan rendemen ekstrak metanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

Diketahui :

- Berat serbuk simplisia : 500 gram
- Berat ekstrak kental : 59,42 gram

Rendemen ekstrak :

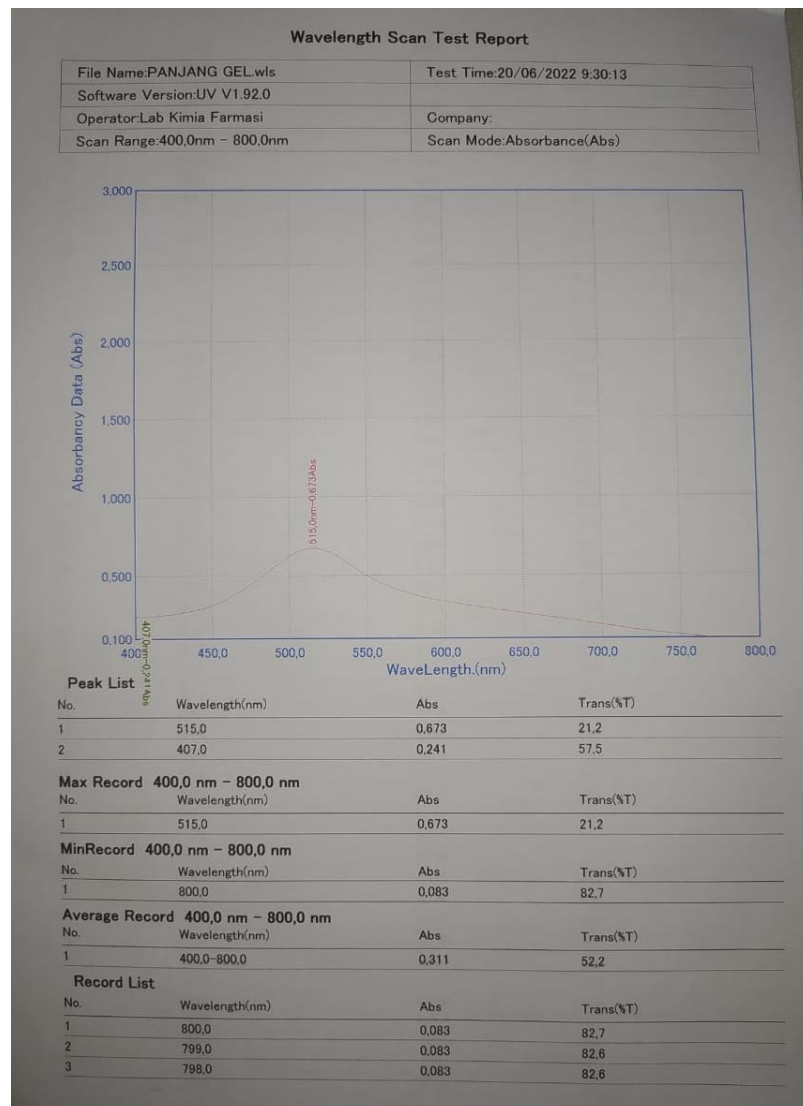
$$\frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100 \% \rightarrow \frac{59,42 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \%$$
$$\rightarrow 11,84 \%$$

Lampiran 4 Skrining Fitokimia

Pengujian	Gambar	Hasil
Alkaloid		Terjadi perubahan warna
Triterpenoid		Terjadi perubahan warna merah tua
Flavonoid		Terbentuk warna merah bata

Saponin		Terbentuk buih atau busa
Tannin		Terjadi perubahan warna biru kehitaman

Lampiran 5 Optimasi Panjang Gelombang



Lampiran 6 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin						
Waktu Inkubasi	Konsentrasi	Log Konsentrasi	Abs	% Inhibisi	Probit	IC ₅₀
Blangko			0,638			
10 menit	0,63	-0,20	0,385	39.66	4.75	8,072
	2,5	0,40	0,351	44.98	4.85	
	5,63	0,75	0,336	47.34	4.92	
	10	1,00	0,311	51.25	5.03	
	15,63	1,19	0,291	54.39	5.10	
20 menit	0,63	-0,20	0,346	42.16	4.80	5,916
	2,5	0,40	0,334	47.49	4.95	
	5,63	0,75	0,324	49.69	5.00	
	10	1,00	0,313	51.41	5.03	
	15,63	1,19	0,300	53.14	5.08	
30 menit	0,63	-0,20	0,351	44.98	4.87	5,861
	2,5	0,40	0,334	47.65	4.95	
	5,63	0,75	0,326	48.90	4.97	
	10	1,00	0,312	51.10	5.03	
	15,63	1,19	0,299	53.14	5.08	
40 menit	0,63	-0,20	0,369	45.77	4.90	5,470
	2,5	0,40	0,335	47.65	4.95	
	5,63	0,75	0,321	49.22	4.97	
	10	1,00	0,310	51.10	5.03	
	15,63	1,19	0,299	52.98	5.08	
50 menit	0,63	-0,20	0,338	47.02	4.92	6,081
	2,5	0,40	0,331	48.12	4.95	
	5,63	0,75	0,321	49.69	5.00	
	10	1,00	0,313	50.94	5.03	
	15,63	1,19	0,311	51.25	5.03	
60 menit	0,63	-0,20	0,343	46.24	4.90	14,061
	2,5	0,40	0,341	46.55	4.92	
	5,63	0,75	0,324	49.22	4.97	
	10	1,00	0,321	49.69	5.00	
	15,63	1,19	0,319	50.00	5.00	

Menit	R ²
10	0,951
20	0,982
30	0,952
40	0,904
50	0,952
60	0,927

Lampiran 7 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao

Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Kulit Biji						
Waktu Inkubasi	Konsentrasi	log konsentrasi	Abs	% Inhibisi	Probit	IC ₅₀
Blangko			0.645			
10 menit	6.25 ppm	0.80	0.331	48.28	4.95	65.13
	25 ppm	1.40	0.329	49.00	4.97	
	56.25 ppm	1.75	0.325	49.61	5.00	
	100 ppm	2.00	0.323	49.92	5.00	
	156.25 ppm	2.19	0.319	50.54	5.03	
20 menit	6.25 ppm	0.80	0.329	49.00	4.97	30.80
	25 ppm	1.40	0.326	49.61	5.00	
	56.25 ppm	1.75	0.324	49.77	5.00	
	100 ppm	2.00	0.319	50.54	5.03	
	156.25 ppm	2.19	0.318	50.70	5.03	
30 menit	6.25 ppm	0.80	0.330	49.15	4.97	23.39
	25 ppm	1.40	0.323	49.92	5.00	
	56.25 ppm	1.75	0.319	50.54	5.03	
	100 ppm	2.00	0.316	51.00	5.03	
	156.25 ppm	2.19	0.313	51.47	5.03	
40 menit	6.25 ppm	0.80	0.327	49.30	4.97	21.96
	25 ppm	1.40	0.322	50.08	5.00	
	56.25 ppm	1.75	0.319	50.54	5.03	
	100 ppm	2.00	0.317	50.85	5.03	
	156.25 ppm	2.19	0.315	51.16	5.05	
50 menit	6.25 ppm	0.80	0.326	49.46	4.97	21.96
	25 ppm	1.40	0.320	50.39	5.00	
	56.25 ppm	1.75	0.318	50.70	5.03	
	100 ppm	2.00	0.316	51.00	5.03	
	156.25 ppm	2.19	0.311	51.78	5.05	
60 menit	6.25 ppm	0.80	0.328	48.75	4.97	30.80
	25 ppm	1.40	0.324	49.77	5.00	
	56.25 ppm	1.75	0.320	50.39	5.00	
	100 ppm	2.00	0.316	51.00	5.03	
	156.25 ppm	2.19	0.313	51.47	5.03	

Menit	R ²
10	0,9252
20	0,9184
30	0,9188
40	0,9711
50	0,9711
60	0,9184

Lampiran 8 Perhitungan Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH

Diketahui :

- Serbuk DPPH = 5 mg
- Volume pelarut = 100 mL

Konsentrasi larutan DPPH

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

2. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao

a. Pembuatan larutan induk ekstrak metanol kulit biji kakao

Diketahui :

- Ekstrak kental = 10 mg
- Volume pelarut = 10 mL

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi larutan induk ekstrak} &= \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000 \\
 &= \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \\
 &= 1000 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

b. Pengenceran konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm

$$\text{Rumus : } M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \rightarrow V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$\begin{aligned}
 \bullet \quad V_1 (50 \text{ ppm}) &= \frac{50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} \\
 &= 0,5 \text{ mL} \rightarrow \frac{0,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 50 \text{ ppm} = 2,5 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$2,5 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2,5 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 6,25 \text{ ppm}$$

- $$V_1 (100 \text{ ppm}) = \frac{100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$= 1 \text{ mL} \rightarrow \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$$

$$10 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 25 \text{ ppm}$$

- $$V_1 (150 \text{ ppm}) = \frac{50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$= 1,5 \text{ mL} \rightarrow \frac{1,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 150 \text{ ppm} = 22,5 \text{ ppm}$$

$$22,5 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$22,5 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 56,25 \text{ ppm}$$

- $$V_1 (200 \text{ ppm}) = \frac{50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$= 2 \text{ mL} \rightarrow \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 200 \text{ ppm} = 40 \text{ ppm}$$

$$40 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$40 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 100 \text{ ppm}$$

- $$V_1 (250 \text{ ppm}) = \frac{50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$= 2,5 \text{ mL} \rightarrow \frac{2,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 250 \text{ ppm} = 62,5 \text{ ppm}$$

$$62,5 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$62,5 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 156,25 \text{ ppm}$$

3. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

a. Pembuatan larutan induk kuersetin

Diketahui :

- Serbuk kuersetin = 2 mg
- Volume pelarut = 10 mL

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi larutan induk kuersetin} &= \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000 \\ &= \frac{2 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 200 \text{ ppm}\end{aligned}$$

b. Pengenceran kuersetin 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm

$$\text{Rumus : } M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \rightarrow V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$\begin{aligned}\bullet \quad V_1 (10 \text{ ppm}) &= \frac{10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}} \\ &= 0,25 \text{ mL} \rightarrow \frac{0,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 10 \text{ ppm} = 0,5 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$0,5 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$0,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 0,62 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned}\bullet \quad V_1 (20 \text{ ppm}) &= \frac{20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}} \\ &= 0,5 \text{ mL} \rightarrow \frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 20 \text{ ppm} = 2 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$2 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$2 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 2,5 \text{ ppm}$$

- $$V_1 (30 \text{ ppm}) = \frac{30 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$$

$$= 0,75 \text{ mL} \rightarrow \frac{0,75 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 30 \text{ ppm} = 4,5 \text{ ppm}$$

$$4,5 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$4,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 5,62 \text{ ppm}$$

- $$V_1 (40 \text{ ppm}) = \frac{40 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$$

$$= 1 \text{ mL} \rightarrow \frac{1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 40 \text{ ppm} = 8 \text{ ppm}$$

$$8 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$8 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

$$M_2 = 10 \text{ ppm}$$

- $$V_1 (50 \text{ ppm}) = \frac{50 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$$

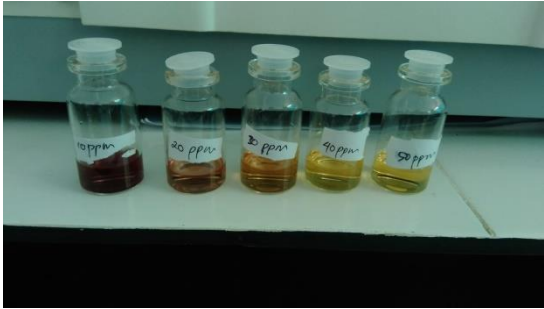
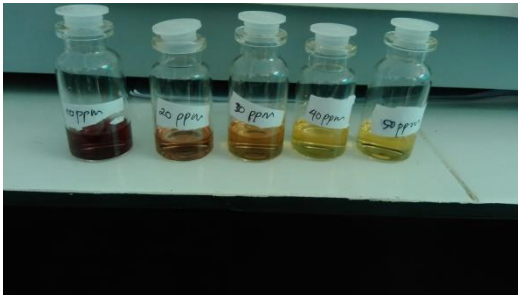
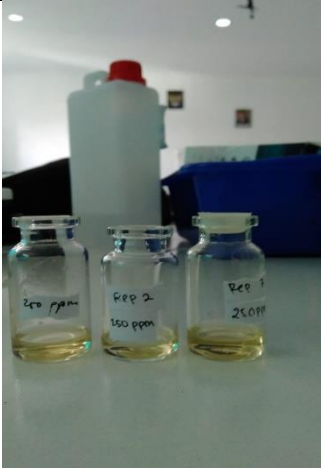
$$= 1,25 \text{ mL} \rightarrow \frac{1,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 50 \text{ ppm} = 12,5 \text{ ppm}$$

$$12,5 \text{ ppm} \rightarrow M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$12,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = M_2 \times 4 \text{ mL}$$

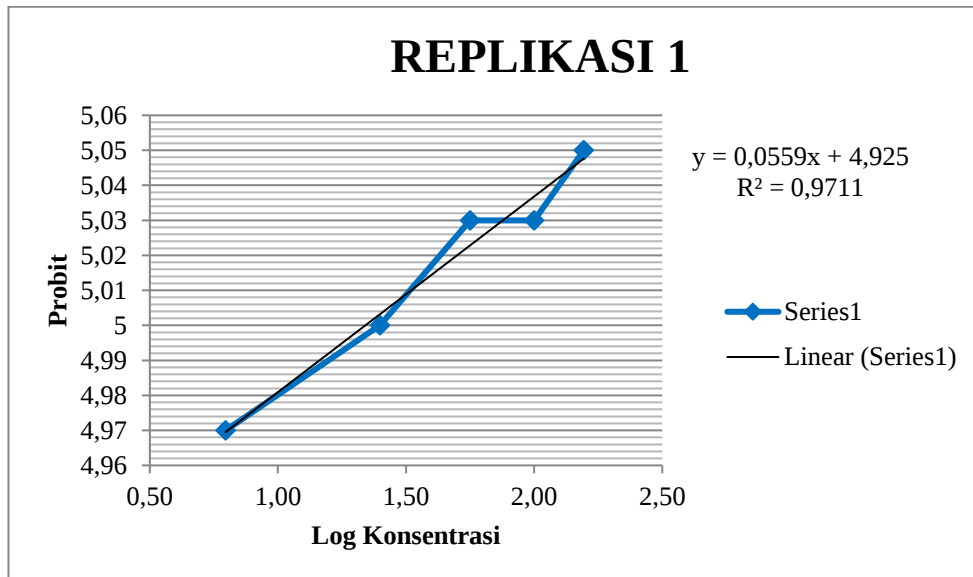
$$M_2 = 15,62 \text{ ppm}$$

Lampiran 9 Dokumentasi Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan kuersetin	Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak metanol kulit biji kakao
	
	
	

Lampiran 10 Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC₅₀ Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao

Replikasi 1



Probit 5 = 50%

Persamaan linier

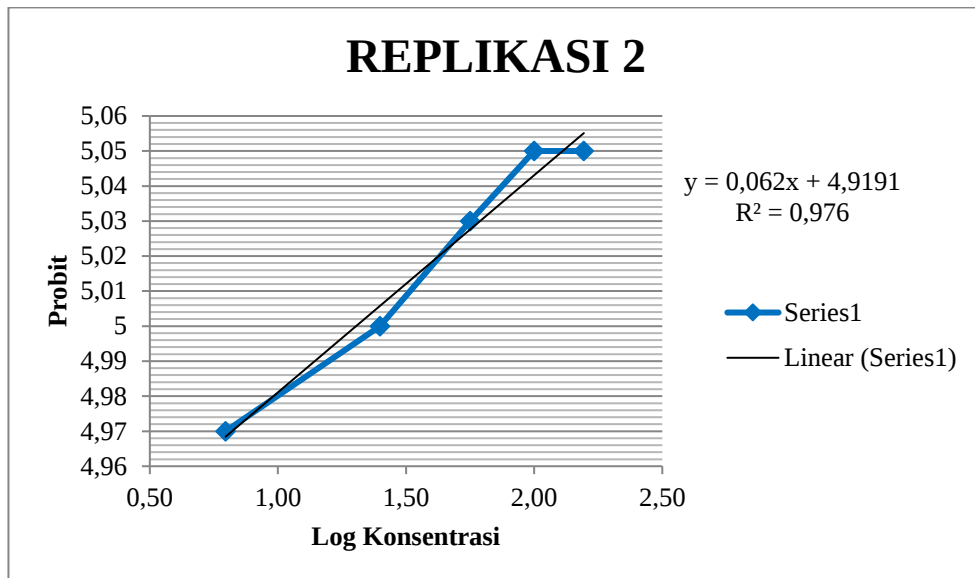
- $y = bx + a$

$$5 = 0.0559x + 4.925$$

$$x = 1.342$$

- $IC_{50} = \text{Antilog } x$
 $= \text{Antilog } 1.342$
 $= 21.96 \text{ (sangat kuat)}$

Replikasi 2



Probit 5 = 50%

Persamaan linier

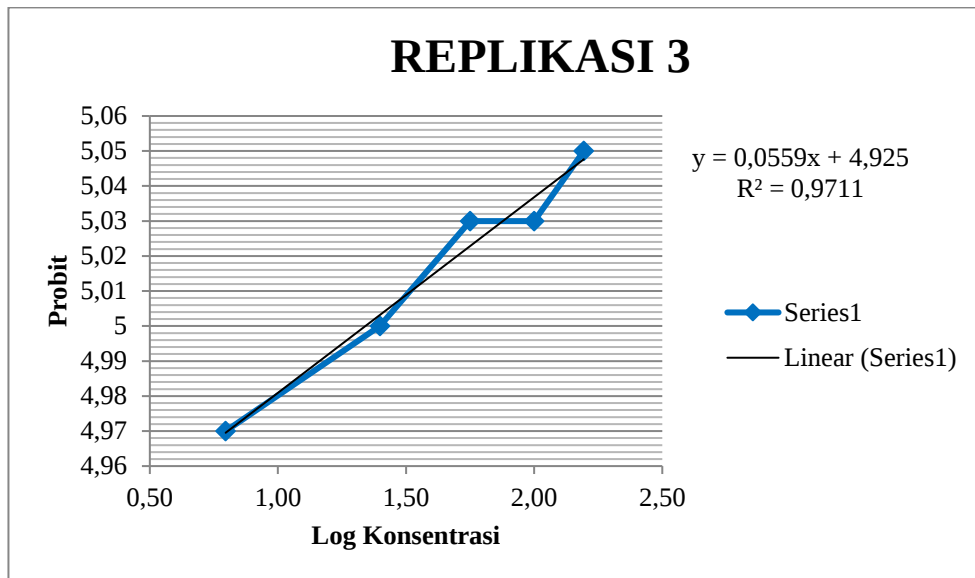
- $y = bx + a$

$$5 = 0.062x + 4.9191$$

$$X = 1.305$$

- $IC_{50} = \text{Antilog } x$
 $= \text{Antilog } 1.305$
 $= 20.18 \text{ (sangat kuat)}$

Replikasi 3



Probit 5 = 50%

Persamaan linier

- $y = bx + a$

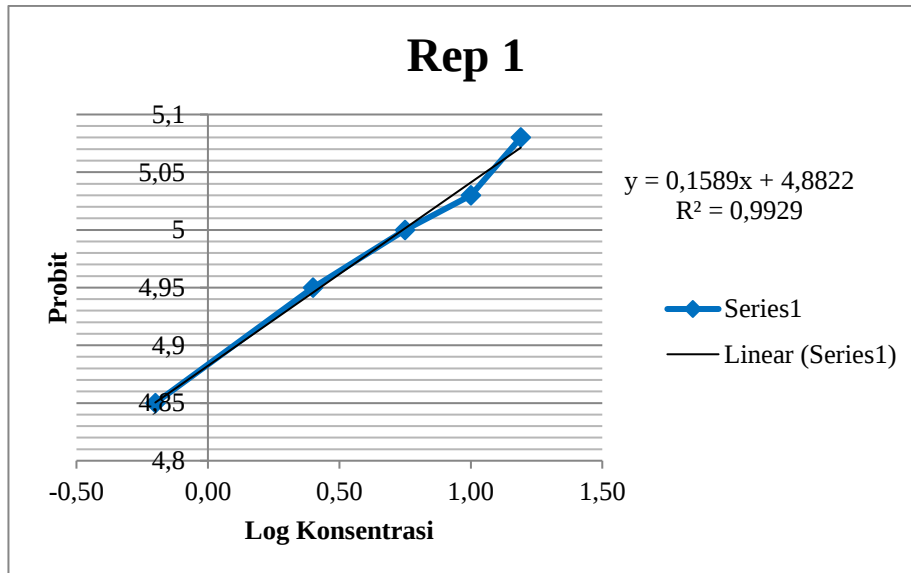
$$5 = 0.0559x + 4.925$$

$$x = 1.342$$

- $IC_{50} = \text{Antilog } x$
 $= \text{Antilog } 1.342$
 $= 21.96 \text{ (sangat kuat)}$

Lampiran 11 Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC₅₀ Kuersetin

Replikasi 1



Probit 5 = 50%

Persamaan linier

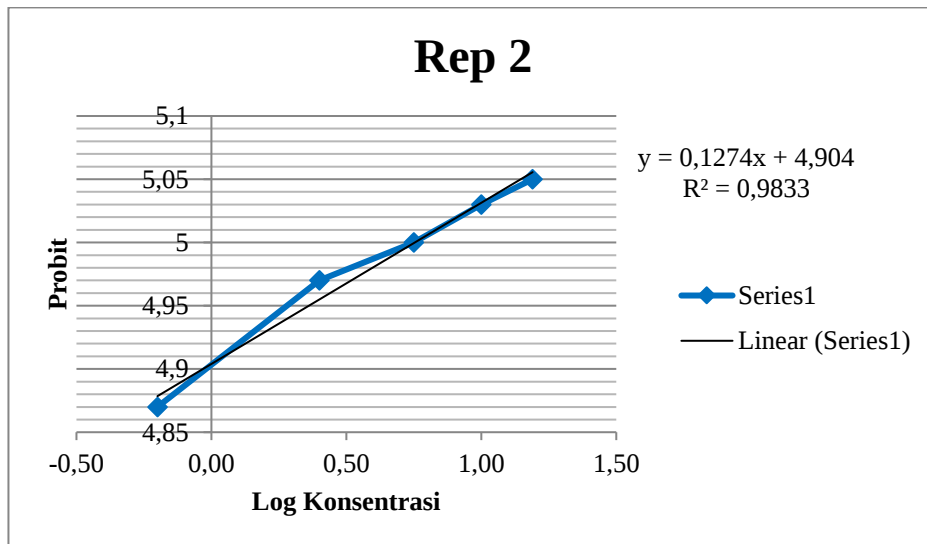
- $y = bx + a$

$$5 = 0.1589x + 4.8822$$

$$x = 0.742$$

- $IC_{50} = \text{Antilog } x$
 $= \text{Antilog } 0.742$
 $= 5.52 \text{ (sangat kuat)}$

Replikasi 2



Probit 5 = 50%

Persamaan linier

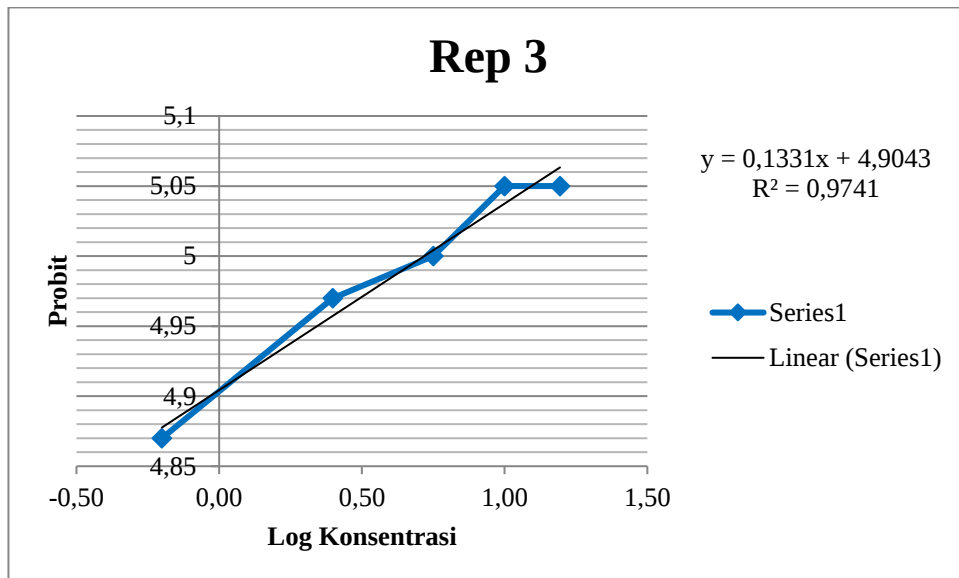
- $y = bx + a$

$$5 = 0.1274x + 4.904$$

$$x = 0.756$$

- $IC_{50} = \text{Antilog } x$
 $= \text{Antilog } 0.756$
 $= 5.70 \text{ (sangat kuat)}$

Replikasi 3



Probit 5 = 50%

Persamaan linier

- $y = bx + a$

$$5 = 0.1331x + 4.9043$$

$$x = 0.719$$

- $IC_{50} = \text{Antilog } x$
 $= \text{Antilog } 0.719$
 $= 5.23 \text{ (sangat kuat)}$

Lampiran 12 *Photometry Test Report* Ekstrak Metanol Kulit Biji Kakao dan Kuersetin

1. Ekstrak metanol kulit biji kakao

Photometry Test Report

File Name:OPTIMASI EKSTRAK OPANG.bas	Test Time:
Software Version:UV V1.92.0	
Operator:Lab Kimia Farmasi	Company:

Test Record List.

No.	WL.(nm)	Abs	Trans(%T)	Test Time	Sample Name
1	515,0	0,640	22,9	01/07/2022 10:24:29	Blangko
2	515,0	0,325	47,2	01/07/2022 10:24:59	50 PPM 50 MENIT R1
3	515,0	0,328	47,1	01/07/2022 10:25:21	100 PPM 50 MENIT R1
4	515,0	0,316	48,2	01/07/2022 10:25:41	150 PPM 50 MENIT R1
5	515,0	0,316	48,2	01/07/2022 10:26:02	200 PPM 50 MENIT R1
6	515,0	0,305	49,5	01/07/2022 10:26:27	250 PPM 50 MENIT R1
7	515,0	0,311	48,9	01/07/2022 10:26:49	200 PPM 50 MENIT R1
8	515,0	0,320	47,9	01/07/2022 10:27:16	100 PPM 50 MENIT R1
9	515,0	0,311	48,9	01/07/2022 10:27:49	200 PPM 50 MENIT R1
10	515,0	0,305	49,5	01/07/2022 10:28:15	250 PPM 50 MENIT R1
11	515,0	0,326	47,2	01/07/2022 10:28:34	50 PPM 50 MENIT R2
12	515,0	0,319	47,9	01/07/2022 10:28:58	100 PPM 50 MENIT R2
13	515,0	0,314	48,7	01/07/2022 10:29:27	150 PPM 50 MENIT R2
14	515,0	0,310	48,9	01/07/2022 10:34:20	200 PPM 50 MENIT R2
15	515,0	0,306	49,4	01/07/2022 10:34:38	250 PPM 50 MENIT R2
16	515,0	0,326	47,2	01/07/2022 10:34:53	50 PPM 50 MENIT R3
17	515,0	0,321	47,8	01/07/2022 10:35:09	100 PPM 50 MENIT R3
18	515,0	0,315	48,3	01/07/2022 10:35:26	150 PPM 50 MENIT R3
19	515,0	0,311	48,9	01/07/2022 10:35:46	200 PPM 50 MENIT R3
20	515,0	0,304	49,5	01/07/2022 9:36:03	250 PPM 50 MENIT R3

2. Kuersetin

Photometry Test Report

File Name: PENGUJIAN KUERSETIN.bas	Test Time:
Software Version: UV V1.92.0	
Operator: Lab Kimia Farmasi	Company:

Test Record List.

No.	WL.(nm)	Abs	Trans(%T)	Test Time	Sample Name
1	515.0	0.638	23.0	22/06/2022 12:30:15	Blanko
2	515.0	0.357	44.0	22/06/2022 11:16:11	10 PPM 40 MENIT R1
3	515.0	0.353	46.4	22/06/2022 11:17:01	10 PPM 40 MENIT R2
4	515.0	0.356	44.1	22/06/2022 11:17:55	10 PPM 40 MENIT R3
5	515.0	0.332	45.4	22/06/2022 11:30:52	20 PPM 40 MENIT R1
6	515.0	0.323	45.2	22/06/2022 11:31:11	20 PPM 40 MENIT R2
7	515.0	0.350	44.7	22/06/2022 11:32:32	20 PPM 40 MENIT R3
8	515.0	0.328	45.6	22/06/2022 11:33:20	20 PPM 40 MENIT R3
9	515.0	0.341	45.6	22/06/2022 11:43:37	30 PPM 40 MENIT R1
10	515.0	0.320	46.4	22/06/2022 11:43:57	30 PPM 40 MENIT R1
11	515.0	0.342	45.5	22/06/2022 11:44:19	30 PPM 40 MENIT R2
12	515.0	0.317	46.8	22/06/2022 11:44:55	30 PPM 40 MENIT R2
13	515.0	0.319	46.7	22/06/2022 11:45:13	30 PPM 40 MENIT R3
14	515.0	0.313	48.9	22/06/2022 12:07:35	40 PPM 40 MENIT R1
15	515.0	0.312	49.2	22/06/2022 12:07:55	40 PPM 40 MENIT R2
16	515.0	0.307	48.8	22/06/2022 12:08:13	40 PPM 40 MENIT R3
17	515.0	0.314	49.8	22/06/2022 12:17:46	50 PPM 40 MENIT R1
18	515.0	0.302	51.0	22/06/2022 12:18:08	50 PPM 40 MENIT R1
19	515.0	0.304	51.1	22/06/2022 12:18:39	50 PPM 40 MENIT R2
20	515.0	0.310	49.9	22/06/2022 12:19:17	50 PPM 40 MENIT R3
21	515.0	0.306	50.6	22/06/2022 12:19:58	50 PPM 40 MENIT R3

Lampiran 13 Tabel Probit

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09