

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT
KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN
METODE DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil)**

SKRIPSI



Oleh :

Dio Anggi Prasetyo

NIM. 18040038

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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT
KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN
METODE DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil*)**

SKRIPSI

Untuk memenuhi persyaratan
Memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



Oleh :

**Dio Anggi Prasetyo
NIM. 18040038**

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

LEMBAR PERSETUJUAN

Hasil penelitian ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti ujian seminar hasil pada Program Studi Sarjana 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 Tugas akhir yang berjudul "*Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil)*" telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

Hari : Senin

Tanggal : 26 September 2022

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi, Universitas dr. Soebandi Jember

Tim Penguji

Ketua Penguji,



I Gusti Ayu Karnasih, S.Kep., Ns., M. Kep. Sp. Mat
NIDN. 4005116802

Penguji I,



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

Penguji II,



apt. Lindawati Setyaningrum, M. Farm
NIDN. 0703068903

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr. Soebandi,



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

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dio Anggi Prasetyo

NIM : 18040038

Program Studi : Sarjana Farmasi, Universitas dr. Soebandi Jember

Menyatakan bahwa Skripsi saya yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil*)” adalah karya saya sendiri dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan suatu perguruan tinggi manapun. Selain itu, sumber informasi yang dikutip penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari ditemukan adanya kecurangan dalam penyusunan Skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Jember, 27 September 2022

Yang menyatakan,



SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN METODE DPPH (1,1-Diphenyl-2- *Picryl Hidrazil*)

Oleh:

Dio Anggi Prasetyo
NIM. 18040038

Pembimbing :

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

PERSEMBAHAN

Dengan rasa syukur yang mendalam telah diselesaikannya Skripsi ini. Skripsi ini dengan penuh hati saya persembahkan kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. Nabi Muhammad SAW yang telah menuntun dari jalan kegelapan menuju jalan yang terang benderang;
3. Skripsi ini saya persembahkan sepenuhnya kepada kedua orang hebat dalam hidup saya, Ayah dan Ibu. Keduanya lah yang membuat segalanya menjadi mungkin sehingga saya bisa sampai pada tahap mana skripsi ini akhirnya selesai. Terima kasih atas segala pengorbanan, nasihat dan doa baik yang tidak pernah berhenti kalian berikan kepadaku. saya selamanya bersyukur dengan keberadaan kalian sebagai orangtua ku;
4. Seluruh dosen Fakultas Ilmu Kesehatan Prodi Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember yang telah memberikan ilmu dan membimbing saya dengan sabar;
5. Terima kasih untuk dosen pembimbing dan dosen penguji yang telah membimbing saya dengan sabar;
6. Terima kasih untuk para teman saya untuk bantuan dan kerja samanya selama ini yang sudah membantu penyelesaian tugas akhir. Buat tim penelitian Aurel, Ghifar, Indra dan iza, dista serta ibu dista dan tak

lupa teman-teman kontrak an yang selalu mensuport dalam penyelesaian tugas akhir;

7. Teman-teman angkatan 2018 Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember;
8. Almamater Universitas dr. Soebandi Jember.

MOTTO

Tidur lebih baik dari pada mengkhawatirkan takdir

“ Gus Baha ”

Jika mimpimu belum ditertawakan orang lain, berarti mimpimu masih kecil

“ Monkey D Luffy ”

Tidak peduli seberapa sulit atau mustahilnya itu, jangan pernah melupakan tujuanmu.

“ Monkey D Luffy ”

ABSTRAK

Anggi, Dio Prasetyo*, Rosita, Ayik Puspaningtyas**, Setyaningrum, Lindawati***. 2022. **Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil).** Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang : Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan alami adalah tumbuhan kakao. Tanaman kakao mengandung senyawa antioksidan dan antiradikal yang telah diuji secara invitro. Beberapa dari senyawa fenolik tersebut yaitu katekin, epikatekin, antosianidin, proantosianidin, asam fenolik, dan beberapa flavonoid lainnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.).

Metode : Sejumlah 500 gram serbuk simplisia kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) diekstraksi dengan cara maserasi dengan cairan pengekstraksi etanol sebanyak 1500 ml selama 3 hari. Sampel yang telah di maserasi kemudian dipisahkan pada *water bath*. Ekstrak etanol tersebut kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat 50 ml.

Hasil Penelitian : Hasil skrining fitokimia menyatakan kulit buah kakao mengandung tanin, flavonoid, fenol, alkaloid. Hasil uji optimasi waktu inkubasi sampel didapatkan waktu terbaik pada menit ke- 40. Parameter yang dilihat adalah nilai R^2 0,9127 dan IC50 yang diperoleh dengan rata-rata 73,149 $\mu\text{g/mL} \pm 1,585 \mu\text{g/mL}$ dan kuersetin dengan rata-rata 1,277 $\mu\text{g/mL} \pm 0,015 \mu\text{g/mL}$

Kesimpulan : Nilai aktivitas antioksidan IC50 dari fraksi etil asetat kulit buah kakao menggunakan metode DPPH menunjukkan aktivitas antioksidan kuat dengan IC50 rata-rata 73,149 $\mu\text{g/mL} \pm 1,585 \mu\text{g/mL}$ dan hasil pengujian aktivitas antioksidan kuersetin menunjukkan aktivitas sangat kuat dengan IC50 rata-rata 1,277 $\mu\text{g/mL} \pm 0,015 \mu\text{g/mL}$.

Kata Kunci : Antioksidan, kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.), DPPH

*Peneliti

** Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Anggi, Dio Prasetyo*, Rosita, Ayik Puspaningtyas**, Setyaningrum, Lindawati***. 2022. **Antioxidant Activity Test of the Ethyl Acetate Fraction of Cocoa Fruit Peel (*Theobroma cacao* L.) Using the DPPH Method (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hydrazil)**. Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program, University of dr. Soebandi.

Introduction : Antioxidants are compounds that can inhibit oxidation reactions, by binding to free radicals and highly reactive molecules. Plants that have potential as natural antioxidants are cocoa plants. Cocoa plants contain antioxidant and anti-radical compounds that have been tested in vitro. Some of these phenolic compounds are catechins, epicatechins, anthocyanidins, proanthocyanidins, phenolic acids, and several other flavonoids. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of cocoa pods (*Theobroma cacao* L.).

Methods : A total of 500 grams of cocoa pod peel simplicia powder (*Theobroma cacao* L.) was extracted by maceration with 1500 ml of ethanol extracting liquid for 3 days. The macerated sample was then concentrated in a water bath. The ethanol extract was then fractionated using 50 ml of ethyl acetate as solvent.

Result : The results of phytochemical screening is obtained that the cocoa pod skin contains tannins, flavonoids, phenols, and alkaloids. Sample incubation time optimization test result is obtained in the best time at 40 minutes. The parameters seen are the R^2 value of 0,9127 and the IC_{50} with an average of $73,149 \mu\text{g/mL} \pm 1,585 \mu\text{g/mL}$ and quercetin with an average of $1,277 \mu\text{g/mL} \pm 0,015 \mu\text{g/mL}$.

Conclusion : The IC_{50} antioxidant activity value of the ethyl acetate fraction of cocoa pods using the DPPH method showed a strong antioxidant activity with an average IC_{50} of $73,149 \mu\text{g/mL} \pm 1,585 \mu\text{g/mL}$ and the results of testing the antioxidant activity of quercetin showed a very strong activity with an average IC_{50} of $1,277 \mu\text{g/mL} \pm 0,015 \mu\text{g/mL}$.

Keywords : Antioxidant, cocoa pod shell (*Theobroma cacao* L.), DPPH

*Author

**Advisor 1

***Advisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya semata sehingga penyusunan Tugas Akhir ini dapat terselesaikan. Tugas Akhir disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi dengan judul “Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode DPPH “.

Penyusunannya dapat terlaksana dengan baik berkat dukungan dan bimbingan dari banyak pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan 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 Jember
3. Dhina Ayu, S.Farm.,M.Kes., Apt selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
4. Dr. Apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M. Farm selaku pembimbing 1
5. Lindawati Setyaningrum, M.Farm., Apt selaku pembimbing 2
6. I Gusti Ayu Karnasih, M. Kep., Ns., Sp. Mat. sebagai penguji utama

Penulis menyadari proposal skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan. Penulis mengharapkan saran dan kritik demi kesempurnaan dan perbaikannya sehingga akhirnya laporan proposal skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi bidang pendidikan dan penerapan di lapangan serta bisa dikembangkan lagi lebih lanjut.

Jember, 27 September 2022

Penulis

DAFTAR ISI

JUDUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI	iv
SKRIPSI.....	vi
PERSEMBAHAN	vii
MOTTO	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT.....	xi
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
DAFTAR SINGKATAN.....	xx
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
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	5
1.4.4 Manfaat Bagi Institutusi Pendidikan	6
1.5 Keaslian Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7

2.1	Tanaman Kulit Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	7
2.1.1	Morfologi Tanaman.....	7
2.1.2	Klasifikasi.....	9
2.1.3	Kandungan Kimia	10
2.1.4	Penelitian Kulit Buah Kakao.....	10
2.1.5	Manfaat Untuk Kesehatan.....	10
2.2	Radikal Bebas	11
2.2.1	Definisi	11
2.2.2	Sumber Radikal Bebas	12
2.2.3	Mekanisme Radikal Bebas.....	12
2.2.4	Penyakit yang Ditimbulkan.....	13
2.3	Antioksidan	14
2.3.1	Definisi	14
2.3.2	Sumber Antioksidan	14
2.3.3	Mekanisme Antioksidan.....	15
2.4	Uji Aktinitas Antioksidan	15
2.4.1	DPPH.....	15
2.4.2	Tingkat Kekuatan.....	16
2.5	Tinjauan Metode Ekstraksi	16
2.5.1	Definisi	16
2.5.2	Macam-macam.....	17
2.5.3	Pelarut.....	17
2.6	Tinjauan Fraksinasi	18
2.7	Instrumen Spektrofotometer UV-Vis	18
2.7.1	Definisi Spektrofotometer UV-Vis.....	18
2.7.2	Jenis Spektrofotometer UV-Vis.....	19
2.7.3	Bagian Spektrofotometer UV-Vis	20
BAB 3.	KERANGKA KONSEP	23
3.1	Kerangka Konseptual.....	23
3.2	Hipotesis	Error! Bookmark not defined.
BAB 4.	METODE PENELITIAN	25

4.1	Jenis Penelitian	25
4.2	Populasi	25
4.3	Sampel Penelitian	25
4.4	Determinasi Tanaman Kakao (<i>Theoroma cacao</i> L.)	25
4.5	Variabel Penelitian	25
4.5.1	Variabel Bebas	25
4.5.2	Variabel Terikat	25
4.5.3	Variabel Terkendali	26
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian	26
4.7	Definisi Operasional	26
4.8	Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data	28
4.8.1	Alat dan Bahan	28
4.8.2	Teknik Pengumpulan Data	28
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....		33
5.1	Identifikasi Senyawa Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma Cacao</i> L.)	33
5.1.1	Hail Determinasi Tanaman	33
5.1.2	Ekstraksi	33
5.1.3	Fraksinasi	34
5.1.4	Skrining Fitokimia	34
5.2	Analisi nilai inhibisi konsentrasi 50% (IC50)	36
5.2.1	Optimasi Panjang Gelombang	36
5.2.2	Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin	37
5.2.3	Optimasi Waktu Inkubasi Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao	37
5.2.4	Pengukuran Absorbansi Kuersetin dan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao	38
5.2.5	Hasil Analisis Nilai IC50 Kuersetin dan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao	40
BAB 6 PEMBAHASAN PENELITIAN.....		41
6.1	Indentifikasi Senyawa Antioksidan Frkasi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma Cacao</i> L.)	41
6.1.1	Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma Cacao</i> L.)	41

6.1.2 Skrining fitokimia Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma Cacao</i> L.).....	43
6.2. Analisis Nilai Inhibisi Konsentrasi 50% (IC50)	45
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	48
7.1 Kesimpulan	48
7.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA	49
DAFTAR LAMPIRAN	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Kakao	9
Gambar 2.2 Diagram alat spektrometer UV-Vis (single beam)	20
Gambar 2.3 Skema Spektrofotometer UV-Vis (Double-beam)	20
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual	23
Gambar 5. 1 Kurva Panjang Gelombang DPPH	36
Gambar 5.2 Grafik linier optimasi waktu kuersetin	37
Gambar 5.3 Grafik linier optimasi waktu sampel	38
Gambar 6. 1 Reduksi DPPH dari senyawa antioksidan	45

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian	6
Tabel 4.1 Definisi Operasional	26
Tabel 5. 1 Hasil ekstrak kulit buah kakao	33
Tabel 5. 2 Hasil Fraksinasi Kulit Buah Kakao	34
Tabel 5. 3 Hasil Skrining Fitoimia Fraksi Etil Asetat Klit Buah Kakao.....	35
Tabel 5. 4 Hasil Absorbansi Kuersetin.....	37
Tabel 5. 5 Hasil Absorbansi Sampel	39
Tabel 5. 6 Hasil Nilai IC50 Kuersetin	40
Tabel 5.7 Hasil Nilai IC50 Sampel	39
Tabel 5. 8 Hasil Nilai IC50 Kuersetin Dan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah kakao	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tumbuhan	57
Lampiran 2. Proses Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat	58
Lampiran 3. Perhitungan Hasil Rendemen	59
Lampiran 4. Skrining Fitokimia	60
Lampiran 5. Optimasi Panjang Gelombang	61
Lampiran 6. Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin	62
Lampiran 7. Optimasi Waktu Inkubasi Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao	63
Lampiran 8. Perhitungan Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH.....	64
Lampiran 9. Dokumentasi Pengujian Aktivitas Antioksidan	69
Lampiran 10. Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC50 Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao.....	70
Lampiran 11. Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC50 Kuersetin.....	73

DAFTAR SINGKATAN

DNA	: <i>Deocyribonucleid acid</i>
DPPH	: <i>1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl</i>
IC50	: <i>Inhibior Contentration 50%</i>
ITIS	: <i>Intgreted Taxonomic Information Syste</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Supeoksida Dismutase</i>
UV-VIS	: <i>Ultra Violet-Visible</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pola kehidupan manusia saat ini telah mengalami perubahan seiring dengan perkembangan waktu. Pola hidup yang sangat berubah adalah pola gaya hidup termasuk pola makan. Pola makan yang tidak sehat disertai sering terpaparnya zat berbahaya ke dalam tubuh dapat menyebabkan penyakit degeneratif. Sebagian besar penyakit diawali oleh reaksi oksidasi berlebihan dalam sel tubuh manusia (Yuslianti, 2018).

Sel manusia seperti pada umumnya eukariotik, untuk hidup dan mempertahankan kehidupannya membutuhkan energi yang dihasilkan dari metabolisme dan pernafasan (respirasi) sel itu sendiri. Energi itu dihasilkan dari berbagai tingkat proses atau reaksi kimiawi intraseluler. Oksidasi didefinisikan sebagai pengurangan elektron sehingga terjadi peningkatan positif. Reaksi oksidasi terjadi setiap saat termasuk ketika bernafas dan proses metabolisme dalam tubuh. Reaksi ini dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Yuslianti, 2018).

Radikal bebas dan spesies oksigen reaktif (ROS) merupakan implikasi dalam sejumlah kondisi patologi dari penyakit tertentu seperti inflamasi, gangguan metabolik, penuaan selular, *atherosclerosis* dan *karcinogenesis*. ROS termasuk radikal hidroksil, radikal anion superoksida, hidrogen peroksida dan oksigen singlet. Radikal bebas dan ROS tersebut mampu memberikan efek kerusakan pada komponen biologi seperti protein, DNA dan lipida. Kerusakan makromolekul tersebut bisa menimbulkan katarak, kanker dan penyakit pembuluh darah.

Penyakit ini dapat diredam oleh senyawa antioksidan, dimana senyawa tersebut berperan dalam menghancurkan serta mentralkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pada sel. Sel memiliki antioksidan alami seperti *superoksida dismutase* (SOD), katalase, reduktase, glutathion peroksidase dan antioksidan yang bisa mempertahankan dan perlindungan dari pengaruh radikal bebas. Peningkatan asupan dari antioksidan bisa menjaga kecukupan status pertahanan antioksidan, yang dinyatakan sebagai keseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam organisme hidup. Antioksidan yang terdapat dalam tubuh harus terdapat dalam jumlah yang memadai (Suryanto, *et al.*, 2009).

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (electron donor) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Jusmiati, *et al.*, 2015). Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Senyawa ini dapat meredam pengaruh negatif dari radikal bebas Untuk melindungi tubuh dari efek radikal bebas maka diperlukan antioksidan atau radikal scavenger. Karena itu penelitian untuk menemukan sumber antioksidan baru perlu dilakukan, terutama yang berasal dari tumbuh-tumbuhan (Latief, *et al.*, 2013).

Tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan alami adalah tumbuhan kakao. Tanaman coklat atau biasa disebut kakao berasal dari famili *Sterculiaceae*. Di

Indonesia tanaman kakao merupakan tanaman perkebunan yang mempunyai arti ekonomi penting sebagai komoditi ekspor. Dengan meningkatnya produksi kakao tersebut maka limbah yang dihasilkan semakin meningkat pula. Limbah kakao terdiri dari kulit buah (76,6%), kulit biji (21,74%) dan plasenta (2,59%). Kulit buah kakao merupakan kulit bagian luar yang menyelubungi biji kakao dengan tekstur yang kasar, tebal dan keras. Limbah tersebut menjadi suatu masalah yang serius yaitu menimbulkan penyakit inokulum yang signifikan bila digunakan sebagai pupuk kompos pada tanaman dan bersifat toksis bila digunakan sebagai pakan ternak. Suatu strategi diperlukan untuk mengkomersialkan produk baru dari limbah kulit buah kakao tanpa berpengaruh pada nilai ekonomi dari biji yang dihasilkan (MIita, 2015). Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (Puslitkoka) didirikan pada 1 Januari 1911 dengan nama *Besoekisch Proefstation* dan telah lebih dari satu abad berperan dalam bidang penelitian dan pengembangan kopi dan kakao di Indonesia. Pusat penelitian ini berada di Desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember.

Tanaman kakao mengandung senyawa antioksidan dan antiradikal yang telah diuji secara invitro. Beberapa dari senyawa fenolik tersebut yaitu katekin, epikatekin, antosianidin, proantosianidin, asam fenolik, dan beberapa flavonoid lainnya. Kulit buah coklat mengandung pigmen kakao (campuran dari flavonoid terpolimerisasi atau terkondensasi meliputi antosianidin, katekin, leukoantosianidin) yang kadang berikatan dengan glukosa, karbohidrat berbobot molekul besar (poliskarida) dan berbobot molekul rendah (monosakarida, oligosakarida) (MIita, 2015).

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut di atas, maka dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada sampel kulit buah kakao menggunakan pelarut etanol 96% dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan etil asetat. Penelitian ini bertujuan untuk melihat seberapa besar potensi antioksidan dari kulit buah kakao menggunakan pelarut etanol 96% dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan etil asetat tersebut. Metode penelitian antioksidan ini menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) dengan spektrofotometer UV-VIS (*Ultra Violet-Visible*) sehingga dengan demikian akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀ (*inhibitor Contentration*) . Metode DPPH digunakan untuk menguji kemampuan suatu komponen sebagai penangkap radikal bebas dalam suatu bahan atau ekstrak. Keunggulan dari metode DPPH adalah dapat dikerjakan secara cepat dan sederhana (Jusmiati, *et al.*, 2015)

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dirumuskan adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana identifikasi senyawa kimia dalam fraksi etil asetat kulit kakao (*Theobroma cacao* L.) mempunyai aktivitas antioksidan ?
2. Berapa nilai inhibisi konsentrai 50% (IC₅₀) pada fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi senyawa kimia dari fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang menghasilkan aktivitas antioksidan.
2. Tujuan penelitian ini untuk menganalisa IC50 pada fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan mendapat beberapa manfaat, Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Dapat diketahui aktivitas antioksidan yang terkandung pada fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH.

1.4.2 Manfaat Bagi Peneliti Lain

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar dalam penelitian selanjutnya untuk pencarian antioksidan baru dari bahan alam dan sebagai sumber informasi dan referensi yang dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam penelitian selanjutnya tentang aktivitas antioksidan.

1.4.3 Manfaat Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan memberi informasi serta sumbangan pengetahuan bagi kemajuan dibidang kesehatan dan pengetahuan alam tentang potensi antioksidan dari bahan alam.

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 memberikan referensi bagi mahasiswa lain.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Penelitian	Persamaan	Perbedaan
(Jusmiati, et al., 2015)	Menggunakan metode DPPH Menggunakan sampel kulit buah kakao	Menggunakan pelarut metanol dilanjutkan dengan fraksi etil asetat, fraksi n butanol dan fraksi n heksan
(Diantika, <i>et al.</i> , 2014)	Menggunakan metode ekstraksi maserasi	Menggunakan pelarut etanol sebesar 70 dan 80% Menggunakan sampel biji kakao
(Nafisa, <i>et al.</i> , 2021)	Menggunakan sampel kulit buah kakao Menggunakan metode DPPH	Menggunakan pelarut etanol 70 % Menggunakan sediaan emulgel

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kulit Kakao (*Theobroma cacao* L)

2.1.1 Morfologi Tanaman

Menurut penelitian Martono, (2013) kakao (*Theobroma cacao* L.) Merupakan salah satu jenis tanaman penyegar yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Tanaman ini mempunyai peran penting sebagai bahan dasar untuk produk pangan, kosmetik, maupun kesehatan. Seluruh bagian tanaman kakao dapat dimanfaatkan sebagai produk yang bernilai ekonomis. Tanaman ini juga termasuk golongan tanaman (perennial) dan merupakan tanaman dikotil, mempunyai 10 pasang kromosom. Habitat asli tanaman kakao ini di hutan tropis dengan curah hujan yang tinggi sehingga tanamannya dapat bertumbuh tinggi. Tanaman kakao menyebar di beberapa negara, di antaranya Belize, 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.

Batang kakao tumbuh tegak, tinggi tanaman di kebun pada umur 3 tahun dengan kisaran 1,8-3 m dan pada umur 12 tahun dapat mencapai 4,5-7 m, untuk kakao yang tumbuh liar ketinggiannya dapat mencapai 20 m. Warna daun tanaman kakao bervariasi dari kecoklatan, coklat, coklat kemerahan, merah, merah muda, merah cerah, merah tua, dan kuning kemerahan. Panjang daunnya mencapai 10-48 cm dan lebar antara 4-20 cm. Tanaman kakao mempunyai akar tunggang yang disertai dengan akar serabut. Akar tanaman kakao berkembang

disekitar permukaan tanah kurang lebih sampai 30 cm. Akar kakao dapat tumbuh mencapai 8 m ke arah samping dan 15 m ke arah bawah. Ukuran bunga tanaman kakao kecil dan halus berwarna putih sedikit ungu kemerahan dan tidak berbau, diameter bunga 1-2 cm. Bunga kakao tergolong bunga sempurna terdiri dari daun kelopak sebanyak 5 helai berwarna merah muda dan benang sari berjumlah 10 helai. Buah kakao merupakan buah dengan daging bijinya sangat lunak. Warna, bentuk, dan ukuran buah kakao bervariasi dan merupakan salah satu karakter penting sebagai pendiri perbedaan antar genotipe kakao. Bentuk buah kakao dibagi menjadi empat golongan, yaitu *Angoleta* (buah berbentuk), *cundaemor* (buah berbentuk *ellips*), *Amelodado* dan *Calabacil* (buah berbentuk bulat). Sedangkan untuk biji kakao dibagi menjadi tiga bagian pokok, yaitu kotiledon (87,10%), kulit (12%), lembaga (0,9%). (Martono, 2013)

Kulit buah kakao adalah bagian luar buah yang kasar dan berbentuk bulat serta relatif tebal. Pada kulit buah kakao terdapat bagian mesokarp atau bagian dinding buah kakao, yang mencakup kulit terluar sampai daging buah sebelum kumpulan biji. Kulit buah kakao merupakan bagian terbesar dari buah kakao (75,52% dari buah kakao segar) (Jusmiati, *et al.*, 2015).



Gambar 2.1 Tanaman Kakao
(Sumber : Dokumen pribadi, 2021)

2.1.2 Klasifikasi

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
Subdivision	: Spermatophyta
Class	: Magnoliopsida
Superorder	: Rosanae
Order	: Malvales
Family	: Malvaceae
Genus	: <i>Theobroma</i> L.
Species	: <i>Theobroma cacao</i> L.

2.1.3 Kandungan Kimia

Menurut Nafisa *et al* (2021) Kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung sejumlah besar polifenol dan flavonoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Kakao mengandung sejumlah besar polifenol, terutama flavonoid dan kelompok flavan-3-ol. Kulit buah kakao terdiri dari senyawa polisakarida (selulosa dan hemiselulosa), lignin, senyawa fenolik, tanin, alkaloid purin, dan cocoa butter (Jusmiati, *et al.*, 2015). Kulit buah kakao memiliki kandungan gizi sebagai berikut yaitu : bahan kering 88%, total digestible nutrient 50,8%, serat 40%, protein kasar 8%. Pada kakao juga dapat ditemukan flavonol seperti kuersetin dan glukosida. Golongan flavonoid ini merupakan antioksidan yang diketahui sangat berpotensi dalam pencegahan penyakit kardiovaskular dan degeneratif, bersifat protektif terhadap radikal bebas dan spesies degeneratif lainnya.

2.1.4 Penelitian Kulit Buah Kakao

Penelitian tentang uji antioksidan pada kulit buah kakao, sebelumnya pernah dilakukan oleh Jusmiati (2015). Berdasarkan penelitian tersebut nilai IC50 menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat baik untuk kulit buah kakao masak maupun kulit buah kakao muda. Selain itu penelitian yang menggunakan kulit buah kakao selain pengujian antioksidan yaitu Antibakteri (Mulyatni *et al.*, 2016).

2.1.5 Manfaat Untuk Kesehatan

Didalam kulit buah kakao terkandung senyawa aktif alkaloid berupa theobromin yang memiliki efek sebagai penenang. Pada kulit buah kakao juga

terdapat senyawa aktif tanin terpolimerisasi atau terkondensasi, seperti katekin, antosianidin, dan leukoantosianidin yang terikat dengan glukosa, dimana senyawa ini memiliki sifat sebagai antibakteri. Keberadaan senyawa ini didalam buah kakao dapat berpotensi menghambat beberapa pertumbuhan bakteri. Pada kulit buah kakao juga terdapat kandungan tanin yang digunakan sebagai anti bakteri dikarenakan mengandung gugus fenol, sehingga memiliki sifat antiseptik. Selaian sebagai anti bakteri, tanin juga juga dapat berperan sebagai astrigen, antidiare, dan antioksidan. (Pappa, *et al.*, 2019). Dilihat dari segi kandungan yang terdapat didalamnya, kulit buah kakao sangat berpotensi untuk dijadikan suatu produk yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh manusia sehingga juga dapat mengatasi permasalahan limbah perkebunan (Fitri 2017).

2.2 Radikal Bebas

2.2.1 Definisi

Radikal bebas merupakan senyawa atau molekul yang didalamnya terkandung satu atau lebih pasangan elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya yang membuat zat ini bersifat tidak stabil dan reaktif, untuk mencapai kestabilannya radikal bebas bereaksi dengan moleku yang ada di sekitarnya agar mendapat pasangan elektron, jika dibiarkan reaksi tersebut akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan mengakibatkan reaksi berantai yang dapat merusak struktur sel, jika tidak dihentikan bisa menimbulkan munculnya penyakit regeneratif seperti kanker, jantung, penuaan dini serta penyakit regeneratif lainnya. Radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan pada komponen-komponen protein, DNA, dan lipida (Atere, *et al.*, 2018).

2.2.2 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas terdiri dari dua sumber yaitu radikal berasal dari dalam tubuh (radikal bebas endogenus) dan sumber radikal bebas yang berasal dari luar tubuh (radikal bebas eksogenus). Sumber endogenus dapat melewati auoksidasi, oksidasi enzimatik, fagositosis dalam respirasi, transpor elektron di mitokondria, oksidasi ion-ion logam transisi, atau melalui ischemik. Radikal bebas endogen berasal dari oksigen yang kita hirup, oksigen merupakan penopang utama kehidupan karena menghasilkan banyak energi, namun hasil samping dari reaksi pembentukan energi tersebut akan menghasilkan ROS (*Reactive Oxygene Species*). ROS merupakan radikal bebas oksigen, molekul dengan elektron tidak berpasangan yang sangat reaktif. Proses pembentukan ROS dalam tubuh ketika proses pembentukan energi, dibentuk karena adanya pencemaran lingkungan, ionisasi dan radiasi ultraviolet, dari diet makanan tinggi lemak, pada pemrosesan makanan, an ketika kadar antioksidan tubuh rendah. Sumbr eksogen atau eksogenus berasal dari luar sistem tubuh, seperti sinar ultraviolet (UV), radaiasi, asap rokok, senyawa kimia karbontetraklorida, senyawa hasil pemanggangan, dan zat pewarna (Yuslianti , 2017).

2.2.3 Mekanisme Radikal Bebas

Dalam tubuh manusia mengalami proses pembentukan radikal bebas secara terus menerus yang berasal dari :

- a. Reaksi reduksi oskidasi biokimiawi yag melibatkan oksigen dan merupakan bagian dari proses metabolisme sel normal.

- b. Respon terhadap radiasi sinar gamma, sinar ultra violet, populasi lingkungan, merokok, hiperoksida dan iskemia.
- c. Proses peradangan, radikal superoksida yang dihasilkan oleh fagosit yang teraktivasi dalam proses fagositosis sebagai reaksi inflamasi dalam jumlah besar.

Molekul yang mudah bereaksi dengan radikal bebas adalah molekul yang mempunyai ikatan atom kurang kuat. Struktur molekul yang bereaksi dengan radikal bebas berubah menjadi radikal bebas baru yang akan bereaksi dengan molekul di dekatnya sehingga secara berantai terbentuk molekul-molekul radikal bebas baru (Yuslianti, 2017).

2.2.4 Penyakit yang Ditimbulkan

Radikal bebas dapat bermanfaat bagi kesehatan jika dalam jumlah normal misalnya, memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah serta organ-organ dalam tubuh, sementara dalam jumlah berlebih mengakibatkan stres oksidatif. Keadaan tersebut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan, hingga ke organ tubuh yang mempercepat terjadinya proses penuaan dan munculnya penyakit. Stres oksidatif dapat menimbulkan kerusakan biokimia pada jaringan nekrosis, peristiwa stres oksidatif diduga kuat mendasari hampir semua patofisiologis penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas, termasuk kanker (Yuslianti, 2017).

2.3 Antioksidan

2.3.1 Definisi

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam artian khusus, oksidasi adalah zat yang menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari radikal bebas dalam oksidasi lipid (Yuslianti , 2017).

2.3.2 Sumber Antioksidan

Sumber antioksidan dibagi menjadi dua macam yaitu antioksidan dalam tubuh (antioksidan enzimatik) dan antioksidan non-enzimatik yang terdiri dari antioksidan alami dan antioksidan yang diperoleh dari hasil sistesis rekasi kimia. Antioksidan enzimatik merupakan antioksidan yang dibuat oleh tubuh kita sendiri yang berupa enzim antara lain superoksida dismutase, glutathione peroxidase, peroksidase dan katalase. Tubuh dapat menghasilkan antioksidan yang berupa enzim yang aktif bila didukung oleh nutrisi pendukung atau mineral yang disebut juga ko-faktor. Antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh yaitu superoksida dismutase, glutathione, katalase. Sumber antioksidan alami banyak diperoleh dari lingkungan sekitar, seperti rempah-rempah, dedaunan, biji-bijian, buah-buahan, sayur-sayuran, tumbuhan dan lain sebagainya. Senyawa antioksidan alami umumnya adalah senyawa fenolik, atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin dan kalkon (Yuslianti , 2017).

2.3.3 Mekanisme Antioksidan

Secara umum mekanisme kerja antioksidan menghambat oksidasi lemak. Oksidasi lemak terdiri dari tiga tahap utama yaitu, inisiasi, propagasi, dan terminasi. Antioksidan yang baik akan bereaksi dengan radikal asam lemak setelah senyawa terbentuk. Dari berbagai antioksidan yang ada, mekanisme kerja serta kemampuannya sebagai antioksidan sangat bervariasi. 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 disebut juga antioksidan pencegah (Yuslianti, 2017).

2.4 Uji Aktinitas Antioksidan

2.4.1 DPPH

Pengujian DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) telah banyak digunakan pada penelitian fitokimia untuk menguji aktivitas penangkap radikal dari ekstrak atau senyawa murni. Metode ini digunakan karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam (Ridho, *et al.*, 2013). DPPH adalah suatu radikal bebas yang diperdagangkan, stabil pada suhu kamar dengan bentuk serbuk ungu tua, dan cepat teroksidasi oleh temperatur dan udara dan sering digunakan untuk mengevaluasi peredaman radikal bebas pada bahan alam (Azizah, *et al.*, 2017).

Hasil dari metode DPPH dapat diamati dengan perubahan larutan dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna menunjukkan bahwa DPPH telah tereduksi oleh proses donasi hydrogen atau elektron dari senyawa antioksidan sehingga

warnanya berubah dari violet menjadi kuning dan tidak memberikan serapan pada panjang gelombang 517 nm (Lung 2017).

2.4.2 Tingkat Kekuatan

Parameter yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan dengan penangkapan radikal bebas DPPH ini adalah nilai konsentrasi hambatan atau Inhibitory Concentration (IC₅₀) atau efficient concentration (EC₅₀). Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam DPPH sebesar 50%. Nilai 0% berarti tidak mempunyai nilai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukkan kedalam persamaan regresi ($Y=AX+B$) dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai koordinatnya (sumbu Y). Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀, masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai x yang diperoleh sebagai IC₅₀.

Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC₅₀ bernilai 50-100 ppm, sedang jika IC₅₀ bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika IC₅₀ bernilai 151-200 ppm (Nasution, et al., 2015).

2.5 Tinjauan Metode Ekstraksi

2.5.1 Definisi

Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen/zat aktif dari suatu campuran padatan atau cairan dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ini

merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian tanaman obat, karena preparasi ekstrak kasar tanaman merupakan titik awal untuk isolasi dan pemurnian komponen kimia yang terdapat pada tanaman (Febriana, 2015).

2.5.2 Macam-macam

Menurut Febriana (2015) ekstraksi secara umum terdiri dari maserasi, refluktasi, sokhletasi, dan perkolasi. Pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Metode ini dipilih karena prinsipnya yang mudah dan sederhana.

a. Maserasi

Menurut Putra *et al* (2014) maseri adalah proses peredaman sampel untuk menarik komponen yang diinginkan dengan kondisi dingin diskontinyu. Sementara itu menurut Chirunnisa *et al* (2019) maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan oleh pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan. Faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi antara lain waktu, suhu, jenis pelarut, perbandingan bahan dan pelarut, dan ukuran partikel. Ekstraksi dengan metode maserasi memiliki kelebihan yaitu terjaminnya zat aktif yang diekstrak tidak akan rusak. Pada saat perendaman bahan akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang diakibatkan oleh perbedaan tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik.

2.5.3 Pelarut

Menurut Romadhoni (2017) pelarut merupakan benda cair atau gas yang dapat melarutkan benda padat, cair maupun gas, yang menghasilkan sebuah

larutan. Pelarut yang umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga digunakan adalah bahan kimia organik yang disebut pelarut organik. Pelarut biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Untuk membedakan antara pelarut dan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar. Pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol yang bersifat polar. Pelarut ideal yang sering digunakan adalah etanol atau campurannya dengan air karena merupakan pelarut pengestraksi yang terbaik untuk hampir semua senyawa dengan berat molekul rendah seperti saponin dan flavonoid.

2.6 Tinjauan Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu proses pemisahan yang dilakukan pada pemisahan golongan senyawa berdasarkan polaritasnya. Pada umumnya ekstraksi yang digunakan untuk pemisahan adalah fraksinasi (cair-cair) dengan menggunakan alat sederhana yaitu corong pisah. Fraksinasi (cair-cair) adalah menarik senyawa pada suatu ekstrak menggunakan dua pelarut yang tidak bercampur seperti air (polar) dengan kloroform (non polar) (Suputri *et al*, 2021).

2.7 Instrumen Spektrofotometer UV-Vis

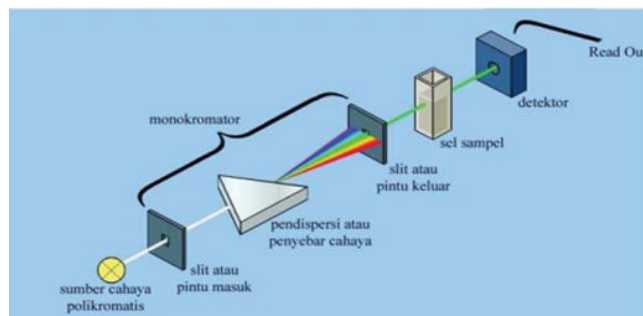
2.7.1 Definisi Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan pengukuran panjang gelombang, intensitas sinar ultraviolet, dan cahaya tampak yang diabsorbsikan oleh sampel. Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Sinar UV berada pada panjang gelombang 200-400 nm. Sedangkan sinar tampak

atau visibel berada pada panjang gelombang 400-800 nm. Spektroskopi UV-Vis biasanya digunakan untuk molekul dan ion anorganik atau kompleks di dalam larutan. Spektrum UV-Vis mempunyai bentuk yang lebar dan hanya sedikit informasi tentang struktur yang bisa didapatkan dari spektrum ini. Akan tetapi spektrum tersebut dapat digunakan untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Syfridiana, 2017).

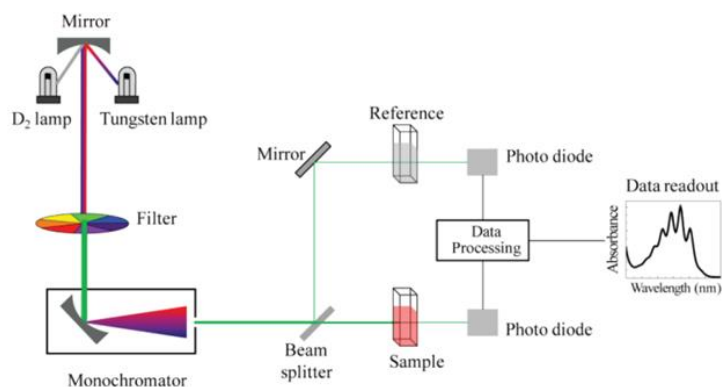
2.7.2 Jenis Spektrofotometer UV-Vis

Terdapat dua tipe instrumen spektrofotometer, yaitu single beam dan double-beam, single-beam instrumen, dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Single-beam instrumen mempunyai beberapa keuntungan yaitu sederhana, harganya murah, dan mengurangi yang ada merupakan keuntungan nyata. Beberapa instrumen menghasilkan single-beam untuk pengukuran sinar ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang paling rendah 190 sampai 210 nm dan paling tinggi adalah 800 sampai 1000 nm. Double-beam dibuat untuk digunakan pada panjang gelombang 190 sampai 750 nm (Suhartati, 2013).



Gambar 2.2 Diagram alat spektrometer UV-Vis (single beam)

Sumber sinar polikromatis, untuk sinar UV adalah lampu deuterium, sedangkan sinar Visibel atau sinar tampak adalah lampu wolfram. Monokromator pada spektrometer UV-Vis digunakan lensa prisma dan filter optik. Sel sampel berupa kuvet yang terbuat dari kuarsa atau gelas dengan lebar yang bervariasi. Detektor berupa detektor foto atau detektor panas atau detektor dioda foto, berfungsi menangkap cahaya yang harus diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Diagram spektrofotometer UV-Vis (Double-beam) dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 2.3 Skema Spektrofotometer UV-Vis (Double-beam)

2.7.3 Bagian Spektrofotometer UV-Vis

Menurut warono (2013) bagian-bagian spektrofotometer UV-Vis terdiri atas sumber radiasi, monokromator, sel atau kuvet, foto sel, detektor, dan tampilan (*display*)

a. Sumber Radiasi

Sumber radiasi berfungsi memberikan energi radiasi pada daerah panjang gelombang yang tepat untuk pengukuran dan mempertahankan intensitas sinar yang tetap pada pengukuran. Sumber radiasi untuk spektrofotometer UV-Vis adalah lampu hidrogen atau deuterium dan lampu flamen. Lampu hidrogen digunakan untuk mendapatkan radiasi di daerah ultraviolet sampai 350 nm. Lampu flamen digunakan untuk daerah sinar tampak sampai inframerah dekat dengan panjang gelombang 350 nm sampai sekitar 250 nm.

b. Monokromator

Monokromator berfungsi menghasilkan radiasi monokromatis yang diperoleh dilewatkan melalui kuvet yang berisi sampel dan blankon secara bersamaan dengan bantuan cermin berputar.

c. Sel atau Kuvet

Sel atau kuvet merupakan tempat bahan yang akan diukur serapannya. Kuvet harus dibuat dari bahan yang tidak menyerap radiasi pada daerah yang digunakan. Umumnya terbuat dari kaca bening tetapi terbuat dari kuarsa baik untuk spektroskopi UV-Vis. Kuvet dari bahan kaca silikat biasa tidak dapat digunakan untuk spektroskopi ultraviolet karena bahan kaca silikat dapat menyerap ultraviolet.

d. Foto Sel

Foto sel berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan zat dan kemudian mengubahnya menjadi energi listrik yang kemudian akan disampaikan ke detektor.

e. Detektor

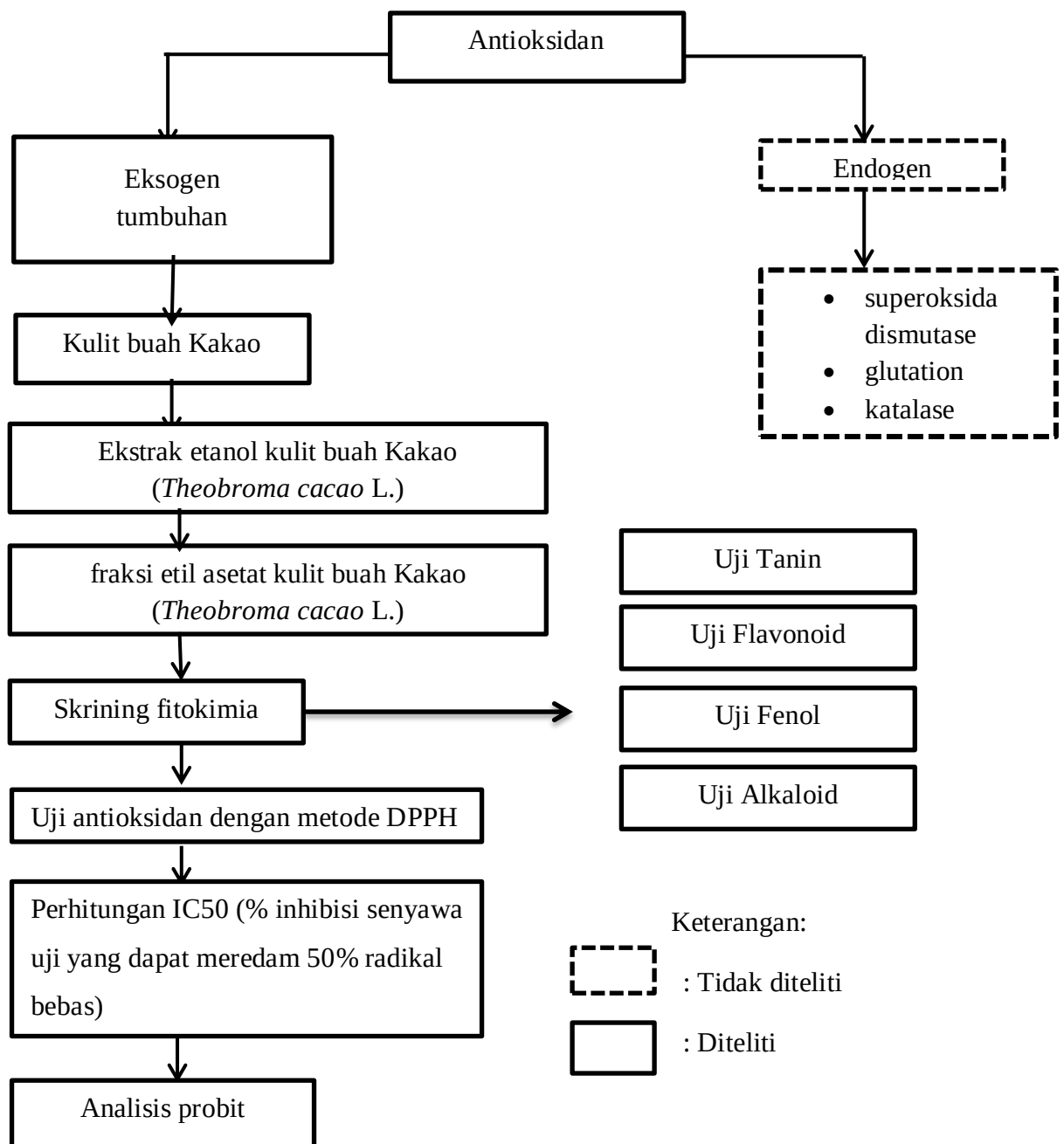
Detektor merupakan material yang dapat menyerap energi foton dan mengubahnya dalam bentuk energi listrik.

f. Display atau Tampilan

Display atau tampilan dapat mengubah sinar listrik dari detektor menjadi pembacaan yang berupa meter atau angka yang sesuai dengan hasil yang dianalisis.

BAB 3. KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan metode DPPH.

4.2 Populasi

Populasi pada penelitian ini menggunakan kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang di dapat dari pusat penelitian kopi dan kakao, jember, jawa timur.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat buah kakao (*Theobroma cacao* L.)

4.4 Determinasi Tanaman Kakao (*Theoroma cacao* L.)

Determinasi tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember dengan membawa semua bagian dari tumbuhan. Tujuan dari determinasi adalah untuk memastikan bahwa tumbuhan tersebut benar-benar spesies dari (*Theobroma cacao* L.).

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang digunakan.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel pada penelitian ini adalah antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai IC50.

4.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah cara pengujian aktivitas antioksidan, cara ekstraksi serbuk simplisia dan pelarut.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas dr. Soebandi Jember dan penelitian ini dimulai bulan Mei 2022.

4.7 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Pengertian	Cara ukur	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
Sampel fraksi etil asetat kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi kemudian dilanjutkan fraksinasi etil asetat.	fraksi etil asetat kulit buah kakao yang diencerkan menggunakan etanol 96% sehingga diperoleh ekstrak kental kemudian di timbang dan di hitung hasil rendemennya	Maserator	Skala rasio	% rendemen

Aktivitas antioksidan	Hasil dari absorbansi pada sampel kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) yang kemudian dihitung persen peredaman dan ditentukan konsentrasi penghambatan 50% (IC50).	Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara memipet dari masing-masing larutan uji sampel dengan konsentrasi (50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm 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.	Spektro UV-Vis	Skala ordinal	• Sangat kuat, jika hasil yang di dapat <50% µg/ml • Kuat, jika yang di dapat 50-100 µg/ml • Sedang, jika yang di dapat 101-150 µg/ml • Lemah, jika yang di dapat >150 µg/ml
-----------------------	---	--	----------------	---------------	---

4.8 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

4.8.1 Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain destilator, spektrofotometer UV-Vis, blender, water bath, ultrasonik, timbangan analitik, toples maserasi, corong buchner, alat gelas, aluminium foil, gelas ekstrak, spatula, vial, kuvet disposable, mikropipet, penyaring, cawan, desikator, dan stopwatch.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari perkebunan Pusat Penelitian Kopi dan kakao yang berada di Desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember, Provinsi Jawa Timur, Indonesia, etanol p.a, etanol 96%, etil asetat, aquadest, dan senyawa DPPH, dan quersetin.

4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

a. Pembuatan Ekstrak Etanol kulit Buah kakao (*Theobroma cacao* L.)

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dari perkebunan Pusat Penelitian Kopi dan kakao yang berada di Desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember, Provinsi Jawa Timur, Indonesia. Sejumlah 500 gram serbuk simplisia kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) diekstraksi dengan cara maserasi dengan cairan pengestraksi etanol sebanyak 1500 ml selama 3 hari sambil diaduk setiap hari. Setelah 3 hari, ekstrak disaring dengan kertas saring. Residu dilakukan remaserasi dengan pelarut yang sama selama 3 jam hingga tersari sempurna dengan cara yang

serupa. Kemudian diuapkan atau dipisahkan larutan tersebut dengan menggunakan Rotary Vacum Evaporator pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kuliat buah kakao yang pekat (Nafisa, *et al.*, 2021).

b. Pembuatan Fraksi Etil Asetat

Timbang simplisia kulit buah kakao, selanjutnya sampel yang telah di maserasi dengan etanol dipekatkan dengan pada *water bath*. Ekstrak etanol tersebut kemudian difraksinasi meggunakan pelarut etil asetat 50 ml (Jusmiati, *et al.*, 2015)

c. Skrining Fitokimia

1. Uji Tanin

Sebanyak 0,2 gram ekstrak sampel dilarutkan kedalam etanol 96% sampai sampel terendam seluruhnya. Kemudian ditambahkan FeCl₃ 1%. Hasil akan membentuk warna biru kehitaman yang menunjukkan kandungan positif tanin (Pappa , *et al.*, 2019).

2. Uji Flavonoid

Uji flavonid dilakukan dengan cara ekstrak ditambahkan ke dalam 4 ml etanol 96% kemudian ditambahkan 2-3 tetes HCL dan diaduk. Apabila terjadi perubahan warna menjadi coklat kekuningan berarti menandakan positif mengandung flavonoid (Pappa , *et al.*, 2019).

3. Uji Fenol

Ekstrak sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 5 ml aquadest. Ditambahkan 3-4 tetes FeCL₃. Senyawa fenol akan memberikan warna hijau hingga biru hitam dengan penambahan larutan FeCL₃ (Chandra, *et al.*, 2019).

4. Uji Alkaloid

Ekstrak diaduk dengan penambahan beberapa ml larutan asam klorida lalu disaring. Filtrat kemudian ditambahkan 1-2 ml pereaksi Dregendorf, terbentuknya endapan kuning menyala manandakan adanya senyawa alkaloid (Kayaputri, *et al.*, 2014).

d. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH

Kristal DPPH diambil sebanyak 1 mg, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 20 mL, kemudian pelarut etanol p.a ditambahkan hingga batas. Sehingga diperoleh konsentrasi larutan DPPH 50 ppm. Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. (Muthia, *et al.*, 2019)

2. Pembuatan Larutan Uji Fraksi Etil Asetat

Fraksi di timbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 ml etanol p.a sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm. Kemudian dibuat seri konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm (Tambunan, *et al.*, 2019)

3. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

Timbang sebanyak 2 mg kuersetin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 20 ml, ditambahkan etanol pa sampai 20 ml, dihomogenkan sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya dibuat pengenceran dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. (Tambunan, *et al.*, 2019).

4. Penentuan Panjang Gelombang

Sebanyak 4 ml larutan DPPH ditambahkan dengan 1 ml etanol p.a. Setelah dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Rastuti, et al., 2012).

5. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan memipet 3,5 ml larutan DPPH dan ditambahkan 0,5 ml larutan uji, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi tiap 10 menit mulai menit ke 0 sampai menit 60 (Retnoningtyas, *et al.*, 2017)

6. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Uji Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao dan Larutan Quarsetin

Pengujian dilakukan dengan cara memipet 0,5 ml larutan sampel dan pembanding dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan 3,5 ml DPPH. Campuran dikocok sampai homogen kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama waktu inubasi yang telah dioptimasi, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Retnoningtyas, *et al.*, 2017).

7. Perhitungan Nilai IC50

Nilai IC50 dapat dihitung berdasarkan % peredaman DPPH dengan persamaan :

$$\% \text{ peredaman} = ((A_b - A_s)) / A_b \times 100 \%$$

Keterangan :

(A_b = absorbansi blanko; A_s = absorbansi sampel)

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration 50%* atau IC50. Nilai IC50 dihitung dengan berdasarkan presentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel mengikuti persamaan yang telah dijelaskan sebelumnya. Setelah didapatkan presentasi inhibisi masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan linier menggunakan persamaan $y = a + bx$ dimana nilai $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC50 (Retnoningtyas, *et al.*, 2017)

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.)

5.1.1 Hail Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman merupakan langkah pertama dalam melakukan penelitian. Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.). Determinasi dilaksanakan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember. Hasil determinasi tanaman yang diperoleh menyatakan bahwa sampel yang akan digunakan benar-benar tanaman kakao. Hasil dapat dilihat pada Lampiran 1.

5.1.2 Ekstraksi

Proses Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut Etanol. Ekstrak yang diperoleh dari proses maserasi berupa ekstrak kental sebanyak 56,73 g dari 500 g serbuk kulit buah kakao (rendemen 11,34 %) pada tabel 5.1. proses pembuatan ekstrak bisa dilihat pada lampiran 2 dan untuk perhitungan hasil % rendemen bisa dilihat pada lampiran 3.

Tabel 5. 1 Hasil ekstrak kulit buah kakao

Simplisia	Ekstrak Kental	Rendemen
500 gram	56,73 gram	11,34%

5.1.3 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan cara hasil proses maserasi yang berupa ekstrak kental difraksinasi menggunakan pelarut campuran etanol : air (1:1) dan ditambahkan dengan pelarut etil asetat menggunakan corong pisah. Hasilnya terdapat 2 fase, fase yang berada dibagian bawah merupakan fraksi etanol-air dan fraksi etil asetat berada dibagian atas. Kemudian hasil fraksinasi dipekatkan menggunakan waterbath hingga diperoleh ekstrak pekat fraksi etil asetat yang diperoleh % rendemen sebesar 32,16 % Proses pembuatan dapat dilihat pada lampiran 2, perhitungan hasil % rendemen dapat dilihat pada lampiran 3 dan untuk hasil fraksinasi kulit buah kakao dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5. 2 Hasil Fraksinasi Kulit Buah Kakao

Ekstrak kental	Fraksi Kental	Rendemen
56,73 gram	18,25 gram	32,16 %

5.1.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis metabolit sekunder yang terkandung pada masing-masing sampel dan juga untuk memperkirakan senyawa apa saja yang memiliki golongan senyawa tanin, flavonoid, fenol, dan alkaloid yang dapat dilihat pada tabel 5.3. Hasil dari pengujian skrining fitokimia dapat dilihat pada lampiran 4.

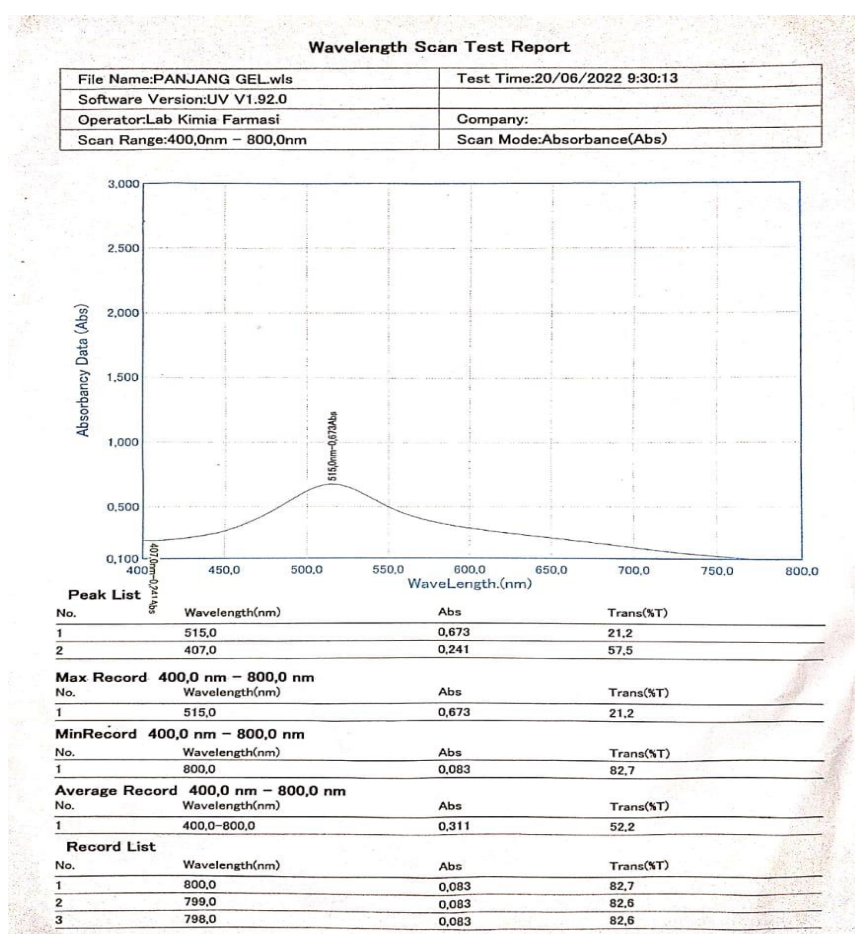
Tabel 5. 3 Hasil Skrining Fitoimia Fraksi Etil Asetat Klit Buah Kakao

Senyawa	Pustaka	Hasil pengamatan	Kesimpulan
Tanin	Sampel positif mengandung tanin jika warnanya biru kehitaman (pappa , <i>et al.</i> , 2019)	Terjadi perubahan warna biru kehitaman	Positif
Flavonoid	Sampel positif mengandung flavonoid jika warnanya coklat kekuningan (pappa , <i>et al.</i> , 2019)	Terjadi perubahan warna coklat kekuningan	Positif
Fenol	Sampel positif mengandung fenol jika warnanya hijau hingga biru hitam (Chandra , <i>et al.</i> , 2019)	Terjadi perubahan warna biru hitam	Positif
Alkaloid	Sampel positif mengandung alkaloid jika terdapat endapan kuning menyala (Kayaputr, <i>et al.</i> , 2014)	Terdapat endapan warna kuning menyala	Positif

5.2 Analisa nilai inhibisi konsentrasi 50% (IC50)

5.2.1 Optimasi Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Serapan permukaan menunjukkan hasil 0,673 pada panjang gelombang 515,0 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum larutan DPPH dapat dilihat pada gambar 5.1 dan lampiran 5.



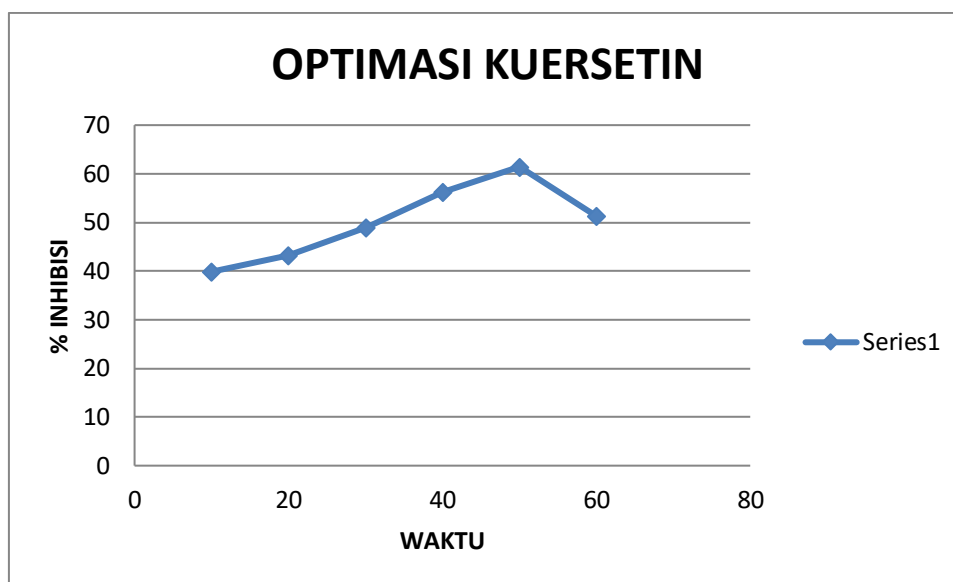
Gambar 5. 1 Kurva Panjang Gelombang DPPH

5.2.2 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

Optomasi waktu inkubasi dilakukan untuk menentukan waktu yang paling optimum suatu zat atau sampel bereaksi dengan maksimal. Hasil uji optimasi waktu inkubasi didapatkan waktu terbaik pada menit ke- 50 dengan cara melihat dari 50% absorbansi blanko dan % inhibisi yang paling tinnggi. Hasil optimasi waktu inkubasi dapat dilihat pada tabel 5.4 dan lampiran 6.

Tabel 5.4 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

WAKTU	KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI
10	2,5	0,368	39,87
20	2,5	0,348	43,14
30	2,5	0,312	49,02
40	2,5	0,268	56,21
50	2,5	0,236	61,44
60	2,5	0,298	51,31



Gambar 5.2 grafik linier optimasi waktu kuersetin

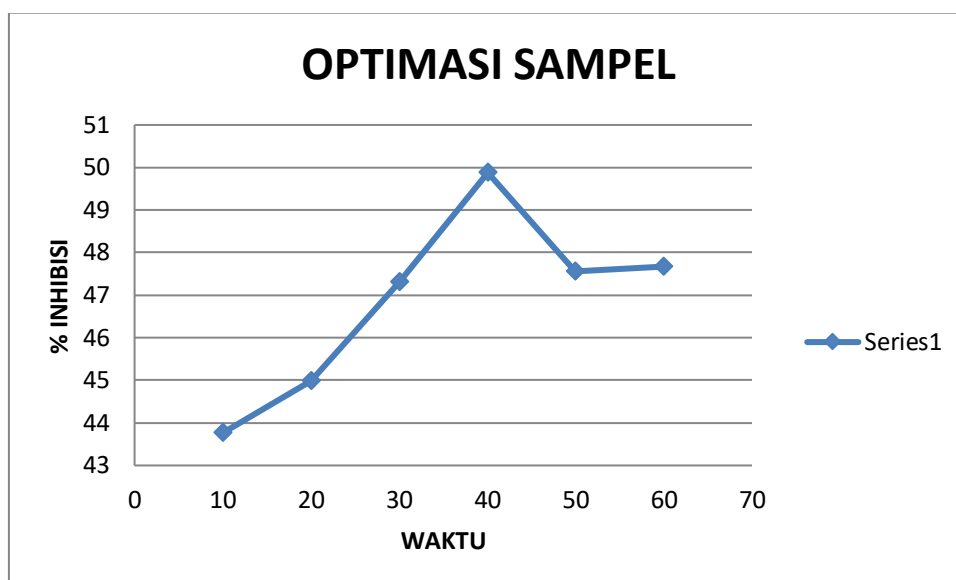
5.2.3 Optimasi Waktu Inkubasi Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao

Hasil uji optimasi waktu inkubasi didapatkan waktu terbaik pada menit ke- 40 dengan cara melihat dari 50% absorbansi blanko dan % inhibisi yang

paling tinggi. Hasil optimasi waktu inkubasi dapat dilihat pada tabel 5.5 dan lampiran 7.

Tabel 5.5 Optimasi Waktu Inkubasi Sampel

WAKTU	KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI
10	78,12	0,46	43,765
20	78,12	0,45	44,988
30	78,12	0,431	47,311
40	78,12	0,41	49,878
50	78,12	0,429	47,555
60	78,12	0,428	47,677



Gambar 5.3 grafik linier optimasi waktu sampel

5.2.4 Pengukuran Absorbansi Kuersetin dan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah

Kakao

Pengujian fraksi etil asetat kulit buah kakao dilakukan inkubasi selama 40 menit dan kuersetin 50 menit diukur pada panjang gelombang 515 nm sesuai dengan optimasi yang telah dilakukan. Hasil pengujian dihitungkan untuk mencari % inhibisi dan probit. Hasil absorbansi fraksi etil asetat kulit buah kakao

dapat dilihat pada tabel 5.6 dan hasil absorbansi kuersetin dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5. 6 Hasil Absorbansi Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao

REPLIKASI BLANKO	KONSENTRASI	ABS 0,818	% INHIBISI	IC50
1	3,12	0,45	44,99	74,523
	12,5	0,437	46,58	
	28,12	0,426	47,92	
	50	0,42	48,66	
	78,12	0,41	49,88	
2	3,12	0,449	45,11	73,509
	12,5	0,435	46,82	
	28,12	0,426	47,92	
	50	0,420	48,66	
	78,12	0,409	50,00	
3	3,12	0,448	45,23	71,414
	12,5	0,436	46,70	
	28,12	0,425	48,04	
	50	0,419	48,78	
	78,12	0,408	50,12	

Tabel 5. 7 Hasil Absorbansi Kuersetin

REPLIKASI BLANKO	KONSENTRASI	ABS 0,612	%INHIBISI	IC50
1	0,1	0,390	36,27	1,294
	0,4	0,352	42,48	
	0,9	0,311	49,18	
	1,6	0,298	51,31	
	2,5	0,236	61,44	
2	0,1	0,389	36,44	1,267
	0,4	0,35	42,81	
	0,9	0,309	49,51	
	1,6	0,296	51,63	
	2,5	0,235	61,60	
3	0,1	0,389	36,44	1,270
	0,4	0,351	42,65	
	0,9	0,309	49,51	
	1,6	0,297	51,47	
	2,5	0,234	61,76	

5.2.5 Hasil Analisis Nilai IC₅₀ Kuersetin dan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah

Kakao

Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan sampel dihitung sebagai persen inhibisi. Hasil perhitungan persen inhibisi dimasukkan kedalam persamaan regresi konsentrasi (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai persen inhibisi sebagai ordinatnya (sumbu Y). Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ < 50 µg/mL, kuat 50 µg/mL – 100 µg/mL, sedang 101 µg/mL – 150 µg/mL, lemah 151 µg/mL – 200 µg/mL (Nasution, *et al.*, 2015). Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Hasil analisis nilai IC₅₀ ekstrak dan kuersetin dapat dilihat pada tabel 5.8.

Tabel 5. 8 Hasil Nilai IC₅₀ Kuersetin Dan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao

Senyawa	IC ₅₀ (replikasi)			$\bar{X} \pm SD$	Kategori
	1	2	3		
Kuersetin	1,294	1,267	1,270	1,277 µg/mL ± 0,015 µg/mL	Sangat kuat
Fraksi	74,523	73,509	71,414	73,149 µg/mL ± 1,585 µg/mL	kuat

Berdasarkan hasil nilai pengujian Fraksi Etil Asetat replikasi 3 kali menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang dimiliki masuk dalam kategori kuat dengan hasil nilai rata-rata IC₅₀ sebesar 73,149 µg/mL. Nilai IC₅₀ kuersetin sebesar 1,277 µg/mL termasuk dalam kategori sangat kuat. Hasil nilai RSD Fraksi Etil Asetat yaitu 2,17 % dan kuersetin sebesar 1,175 %.

BAB 6 PEMBAHASAN PENELITIAN

6.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*)

6.1.1 Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah kakao yang diperoleh dari Perkebunan Puslit Penelitian Kopi dan Kakao Jember berupa serbuk kulit buah kakao. Serbuk sebanyak 500 gram diekstraksi menggunakan pelarut etanol sebanyak 1500 ml dengan menggunakan metode maserasi yang dilakukan selama 3 hari. Setelah 3 hari ekstrak disaring kemudian hasil residu diremaserasi dengan pelarut yang sama selama 3 jam hingga tersari sempurna dengan cara yang sama. Tujuan dilakukan remaserasi untuk menarik senyawa yang kemungkinan masih tertinggal pada saat proses maserasi. (Nafisa, *et al.*, 2021). Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan oleh pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan. Faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi antara lain waktu, suhu, jenis pelarut, perbandingan bahan dan pelarut, dan ukuran partikel. Ekstraksi dengan metode maserasi memiliki kelebihan yaitu terjaminnya zat aktif yang diekstrak tidak akan rusak. Pada saat perendaman bahan akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang diakibatkan oleh perbedaan tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik (Chirunnisa *et al* 2019).

Sampel yang telah di maserasi dengan etanol kemudian dipekatkan dengan *water bath*. Ekstrak etanol tersebut kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat (Jusmiati, *et al.*, 2015). Hasil fraksinasi kemudian dipekatkan lagi dengan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental.

Hasil ekstrak kental kulit buah kakao dari proses maserasi di peroleh sebanyak 56,73 g dari 500 g simplisia, rendemen yang dihasilka yaitu 11,34 %. Hasil yang diperoleh dari proses fraksinasi yaitu sebanyak 18,25 g dan rendemen yang dihasilkan adalah 32,16 %. Rendemen adalah perbandingan berat kering produk yang dihasilkan dengan berat bahan baku. (Dewatisari, *et al.*, 2017). Fraksinasi merupakan suatu cara untuk memisahkan senyawa berdasarkan sifat kepolarannya. Senyawa polar akan masuk ke polar, begitupula senyawa non polar akan masuk pada pelarut non polar. (Lona, 2018). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu etil asetat (pelarut semi polar), dan air (pelarut polar). Senyawa metabolit yang dapat tertarik pada pelarut semi polar antara lain flavonoid, saponin, alkaloid, dan lain-lain. Sedangkan senyawa yang dapat tertarik pada pelarut polar diantaranya yaitu senyawa-senyawa polifenol, flavonoid dan lain-lain. Persen rendemen yang didapat dari proses maserasi dan fraksinasi berbeda-beda, hal ini disebabkan kareana adanya perbedaan kemampuan menarik senyawa dari masing-masing pelarut yang digunakan (Anjaswati, *et al.*, 2021). Persentase rendemen dari fraksi etil asetat lebih besar dari pada maserasi menggunakan etanol 96 %. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terkandung dalam kulit buah kakao lebih banyak senyawa yang bersifat semi polar (Jusmiati, *et al.*, 2015)

6.1.2 Skrining fitokimia Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.)

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti. Metode skrining fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujia warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Kristianti , *et al* ., 2008). Uji fitokimia merupakan salah satu langkah penting dalam mengungkap potensi sumber daya tumbuhan obat sebagai antibiotik, antioksidan, dan atibakteri (Simaremare , 2014). Hasil analisis senyawa fitokimia diperoleh empat senyawa fitokimia yang terkandung dalam fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.). Keempat senyawa tersebut adalah senyawa golongan tanin, flavonoid, fenol, dan alkaloid. Senyawa yang dihasilkan sesuai dengan penelitiaan yang dilakukan oleh Nafisa *et al.*,(2021) pada formulasi dan uji aktivitas antioksidan emul gel ekstrak kulit buah kakao yang menyebutkan bahwa terdapat kandungan senyawa kimia seperti tanin, flavonoid, fenol, dan alkaloid.

a. Tanin

Pada uji tanin ekstrak sebanyak 0,2 gram dilarutkan kedalam etanol sampai terendam seluruhnya, kemudian ditambahkan fecl₃ 1% 3-4 tetes. Tanin merupakan senyawa fenolik yang cenderung larut dalam pelarut polar. Tujuan penambahan Fecl₃ untuk menentukan apakah kulit buah kakao mengandung gugus fenol, adanya gugus fenol ditunjukkan dengan warna hijau kehitaman dan biru kehitaman setelah

ditambahkan FeCl_3 . (Muthmainnah , 2017). Hasil yang didaapat positif karena terbentuk warna biru kehitaman.

b. Flavonoid

Hasil pengujian flavonoid menandakan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak kulit buah kakao. Adanya perubahan warna setelah ekstrak ditambahkan etanol kemudian ditambahkan HCL. Seusai dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh (Pappa, *et al.*, 2019). Tujuan penambahan HCL adalah untuk mereduksi inti benopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga.

c. Fenol

Hasil pengujian fenol pada ekstrak kulit buah kakao menandakan adanya kandungan fenol setelah ekstrak dilarutkan kedalam aquadest kemudian ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3-4 tetes mengalami perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Tujuan penambahan FeCl_3 untuk menentukan apakah kulit buah kakao mengandung gugus fenol, adanya gugus fenol ditunjukkan dengan warna hijau kehitaman dan biru kehitaman setelah ditambahkan FeCl_3 . (Muthmainnah , 2017)

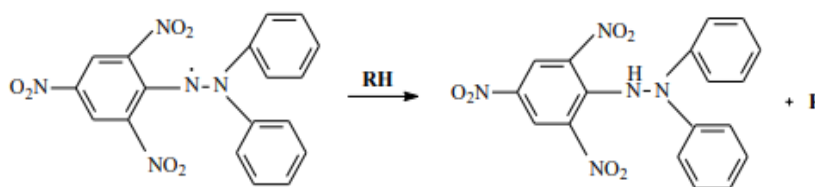
d. Alkaloid

Hasil pengujian alkaloid menunjukkan hasil positif setelah ditambahkan asam klorida dan pereaksi Dregendrof terbentuk endapan kuning menyala. Penambahan asam klorida bertujuan untuk menarik senyawa alkaloid dalam ekstrak karena alkaloid bersifat basa maka

dengan penambahan asam klorida akan erbentuk garam, sehingga alkaloid akan terpisah dengan komponen-komponen lain dari sel tumbuhan yang ikut terekstrak dengan mendistribusikannya ke fase asam (Meigaria, *et al.*, 2016)

6.2. Analisis Nilai Inhibisi Konsentrasi 50% (IC50)

Uji aktivitas antioksidan dalam penelitian ini menggunakan metode peredaman terhadap radikal bebas DPPH yang diujikan pada fraksi etil asetat kulit buah kakao. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan pada fraksi tersebut dalam mereduksi radikal bebas DPPH yang dapat dilihat dari nilai IC50 yang diperoleh. Nilai IC50 didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam DPPH sebesar 50% (Nasution, *et al.*, 2015). Hasil dari metode DPPH dapat diamati dengan perubahan larutan dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna menunjukkan bahwa DPPH telah tereduksi oleh proses donasi hydrogen atau elektron dari senyawa antioksidan sehingga warnanya berubah dari ungu menjadi kuning dan tidak memberikan serapan pada panjang gelombang 515 nm (Lung, 2017).



Gambar 6. 1 Reduksi DPPH dari senyawa antioksidan

Sebelum melakukan pengujian aktivitas antioksidan dilakukan penentuan panjang gelombang maksimal terlebih dahulu. Pada penentuan panjang gelombang larutan DPPH digunakan sebagai blanko. Larutan induk DPPH

diambil dan dimasukkan kedalam kuvet, kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Rastuti, *et al.*, 2012). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH yang diperoleh adalah λ_{max} 515 nm dengan absorbansi 0,673 dapat dilihat pada lampiran 5. Panjang gelombang yang diperoleh sesuai dengan penelitian (Kuntorini, *et al.*, 2010). Penetapan waktu inkubasi optimum ditunjukkan untuk menentukan waktu penyimpanan yang memberikan serapan stabil atau waktu yang dibutuhkan oleh suatu zat agar dapat bereaksi secara maksimal. Pengukuran waktu inkubasi optimum dilakukan pada panjang gelombang 515 nm selama 60 menit dengan selang waktu 10 menit, dari hasil waktu inkubasi optimum yang didapat pada menit ke-50 untuk kuersetin dan menit ke-40 untuk fraksi etil asetat kulit buah kakao. Hasil dari optimasi waktu inkubasi sesuai dengan penelitian penetapan kadar flavonoid secara spektrofotometri visibel pada daun jambu biji dimana hasil sampel menunjukkan waktu ke-40 menit dan kuersetin menunjukkan waktu ke-50 menit, penelitian ini dilakukan oleh (Tari, *et al.*, 2022).

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mereaksikan sampel fraksi etil asetat dengan larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum. Nilai penyerapan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji dihitung sebagai persentase peredaman. Kemudian nilai IC₅₀ dihitung dari regresi linier yang diperoleh.

Nilai IC₅₀ diperoleh berdasarkan persamaan regresi linier yang didapat dengan memplot konsentrasi larutan uji dan persen peredaman DPPH dengan konsentrasi larutan uji ($\mu\text{g/mL}$) sebagai absis dan nilai persen inhibisi sebagai

ordinat. Hasil persamaan regresi dapat dilihat pada lampiran 10. Nilai IC₅₀ sebagai antioksidan fraksi etil asetat kulit buah kakao didapatkan nilai Replikasi 1= 74,523 µg/mL, Replikasi 2= 73,509 µg/mL dan Replikasi 3=71,414 µg/mL dengan nilai rata-rata 73,143 µg/mL, termasuk dalam kategori kuat. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Jusmiati, *et al.*, 2015) dengan judul uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol kemudian difraksinasi dengan etil asetat tetapi tidak dilakukan replikasi pengujian memiliki aktifitas antioksidan tinggi dengan nilai IC₅₀ 9,3 µg/mL dengan kategori sangat kuat. Hasil yang diperoleh memiliki aktivitas antioksidan yang yang berbeda. Perbedaan ini diduga disebabkan penggunaan pelarut dalam proses ekstraksi yang dilakukan. Pelarut metanol lebih polar, sehingga lebih baik dalam menangkap senyawa polar yang terkandung dalam ekstrak yang berfungsi sebagai antioksidan (Jusmiati, *et al.*, 2015)

Pada penelitian menggunakan pembandingan kuersetin untuk mengetahui bahwa metode yang digunakan sudah benar. Kuersetin memiliki aktivitas antioksidan jauh lebih baik dari pada fraksi etil asetat kulit buah kakao yang disebabkan karena kuersetin berupa isolat yang hanya terdiri satu golongan senyawa saja dan sudah terbukti terbukti memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat (Handayani, *et al.*, 2020). Hasil dari penelitian ini kuersetin diperoleh nilai IC₅₀ dengan rata-rata 1,277 µg/mL. Aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat kulit buah kakao lebih rendah karena terdiri dari berbagai golongan senyawa yang aktivitas antioksidannya belum di ketahui secara pasti.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Kandungan kimia yang terdapat pada fraksi etil asetat kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) adalah tanin, flavonoid, fenol, alkaloid.
2. Nilai aktivitas antioksidan IC₅₀ dari fraksi etil asetat kulit buah kakao menggunakan metode DPPH menunjukkan aktivitas antioksidan kuat dengan IC₅₀ rata-rata 73,149 µg/mL , nilai SD 1,585 µg/mL dan hasil pengujian aktivitas antioksidan kuersetin menunjukkan aktivitas sangat kuat dengan IC₅₀ rata-rata 1,277 µg/mL, nilai SD 0,015 µg/mL.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode yang lain seperti FRAP, ABTS, dan CUPRAC untuk memperkuat hasil uji aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
2. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan senyawa lain yang terdapat pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) diberbagai tempat yang berbeda atau instrumen yang berbeda.
3. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan pada sampel tanaman kakao pada bagian lain untuk memperkuat hasil uji aktivitas antioksidannya.
4. Perlu dilakukan penambahan informasi terkait kemajuan ilmu kesehatan berbahan herbal terkait tanaman kakao sebagai senyawa antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

A Jusmiati, Rusli Rolan dan Rijai Laode aktivitas antioksidan kulit buah kakao masak dan kulit buah kako muda [Jurnal]. - Samarinda, Kalimantan Timur : Jurnal Sains dan Kesehatan, 2015. - p-ISSN: 2303-0267, e-ISSN: 2407-6082 : Vol. 1.

Anjaswati Dewi, Pratimasari Diah dan Nirwana Ardy Prian perbandingan rendemen ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air daun bit menggunakan fraksi bertingkat [Artikel]. - surakarta : [s.n.], agustus 2021. - agustus, 2021 : Vol. 1.

Atere, T. G., Akinloye, O. A., Ugbaja, R. N., Ojo, D. A., & Dealtry, G. (2018). In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of standardized extract of *Costus afer* leaf. *Food Science and Human Wellness*, 7(4), 266-272.

Azizah, Z., Zulharmita, dan E. Zulfian. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Vitamin C Ekstrak Buah Naga Merah Keunguan (*Hylocereus lemairei* (Hook.) britton & rose) Secara Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Farmasi Higea*. 9(1):42–43.

Chandra Boy [et al.] phytochemical screening and antioxidant activities of kemangi leaf (*Ocimum tenuiflorum*L.) methanol extract using dpph (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) method [Journal] // journal of

pharmaceuticaland sciences(JPS). - Padang : [s.n.], Julli-desember 2019. - 2656-3088 : Vol. 2 No. 2.

Chirunnisa Sarah, Wartini Ni Made dan Suhendra Lutfi Pengaruh Suhu dan Waktu Maserasi terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) sebagai Sumber Saponin [Jurnal]. - Bali : [s.n.], Desember 2019. - ISSN : 2503-488X : Vol. vol 7, No. 4. - hal. 551-560.

Dewatisari Whika Febria, Rumiyaniti Leni dan Rakhmawati Ismi rendemen dan skrining fitokimia pada ekstrak daun sanseviera sp [Jurnal] // jurnal penelitian pertanian terapan. - lampung : [s.n.], 2017. - eISSN 2047-1781 : Vol. 17 no.3. - hal. 198-202.

Diantika Fitrah, Sutan Sandra Malin dan Yulianingsih Rini pengaruh lama ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol terhadap ekstraksi antioksidan biji kakao (*Theobroma cacao* L.) [Jurnal] // Jurnal Teknologi Pertanian. - malang : [s.n.], desember 2014. - Vol. 15. - hal. 1-6.

Febrina, L., Rusli, R., Muflihah, F. (2015). Optimalisasi Ekstraksi Dan Uji Metabolit Sekunder Tumbuhan Libo (*Ficus Variegata* Blume). J. Trop. Pharm. Chem. Vol 3. No. 2. Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Farmaka Tropis Fakultas Farmasi Universitas M.

Harianingsih [et al.] identifikasi gc- ms ekstrak minyak atsiri dari sereh wangi (*Cymbopogon winterianus*) menggunakan pelarut metanol [Jurnal] //

techno. - semarang : [s.n.], April 2017. - 1410 - 8607 : Vol. 18 No. 1. - hal. 023 – 027.

Handayani Selpida, Kurniawati Ida and Rasyid Faradiba Abdul Uji aktivitas antiksidan ekstrak daun karet kebo (*Ficus Elastica*) dengan metode peredaman radikal bebas DPPH [Journal] // Jurnal Farmasi Galenika. - Makasar : [s.n.], 2020. - ISSN: 2442-8744 : Vol. 6(1). - pp. 141-150.

Latief Madyawati, Tafzi Fitry dan Saputra Andriyanto Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Beberapa Bagian Tanaman Kayu Manis (*Cinnamomum Burmani*) Asal Kabupaten Kerinci Provinsi Jambi [Jurnal]. - lampung : [s.n.], 2013.

Lona, A. T., 2018, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, dan Air dari Ekstrak Daun Hijau Tanaman Pucuk Merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Lung, S., Destiani, P. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan metode DPPH. Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang.

Martono Budi karakteristik morfologi dan kegiatan plasma nutfah tanaman kakao [Jurnal]. - Sukabumi : [s.n.], 2013.

- MIlita Nur Formulasi krim dari kulit buah kakao (*theobroma cacao l.*) berkhasiat antioksidan [Jurnal]. - kalimantan timur : J. Trop. Pharm. Chem, 2015. - p- ISSN: 2087-7099; e-ISSN: 2407-6090 : Vol. vol. 3. - hal. 1-10.
- Muthia Rahmi, Saputri Revita and Verawati Sulastris Azistina Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Mundar (*Garcinia forbesii* King.) Menggunakan Metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil) [Journal] // Jurnal Pharmascience. - Banjarbaru,Indonesia : [s.n.], Februari 2019. - ISSN-Print. 2355 – 5386 : Vol. 06, No. 01. - pp. 74-82.
- Nafisa Safira, Fahleni dan Salsabilla Nadilla formulasi dan uji aktivitas antioksidan emulgel formulasi dan uji aktivitas antioksidan emulgel [Jurnal] // Jurnal Ilmiah Farmako Bahari. - jakarta selatan : [s.n.], juli 2021. - Vol. 12. - hal. 117-121.
- Nasution, Putri Adaria, Batubara Ridwanti, S. (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.
- Pappa Suryadi, Jamaluddin Abdul Wahid dan Ris Adryani kadar tanin pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) kabupaten poliwalimandar dan toraja utara [Jurnal]// Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry). - Makasar : [s.n.], Oktober 2019. - ISSN 2302-7274 : Vol. 7 Nomor 2,.

Putra A.A Bawa [et al.] ekstraksi zat warna alam dari bonggol tanaman pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan metode maserasi, refluks, dan sokletasi [Jurnal] // jurnal kimia 8. - Bukit jimbaran : [s.n.], januari 2014. - ISSN 1907-9850 : Vol. (1). - hal. 113-119.

Ridho Ery Al, Sari Rafika dan Wahdaningsih sri antioxidant activitiy assay from methanol extract of lakum fruit (*cayratia trifolia*) with dpph (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method [Jurnal]. - tanjungpura : Ery al Ridho, desember 2013.

Rastuti Undri and Purwati uji aktivitas antioksidan ekstrak daun kalba (*Albizia falcataria*) dengan metode dpph(1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan identifikasi senyawa metabolit sekundernya [Article]. - Purwokerto, Jawa Tengah : [s.n.], Mei 2012. - Vol. 07. No 1. - pp. 33-42.

Retnoningtyas Yuni, Hamzah Hafidi Muhammad and Kristiningrum Nia Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Daun Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dan Daun Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) dengan Metode DPPH [Journal] // Jurnal Farma Indonesia. - jember : [s.n.], 2017. - Vol. 9 No. 1.

Romadhoni (2017) 'Isolasi Pektin Dari Kulit Pisang Kepok (*Musa Balbisiana* Abb) Dengan Metode Refluks Menggunakan Pelarut Hcl Encer', *Manajemen Pengembangan Bakat Minat Siswa Di Mts Al-Wathoniyyah Pedurungan Semarang*, pp. 2–3.

Rorong Johnly Alfrets uji aktivitas antioksidan dari daun cengkeh (*Eugenia Carryophyllus*) dengan metode dpsh [Jurnal]. - manado : Chem. Prog., november 2008. - Vol. 1. - hal. 1-6.

Sanchez, S., Coronado, S., Canongo, V., Carlos, H. (2019). *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*. IntechOpen, DOI:10.5772/intechopen.85270.

Suhartati Tati dasar-dasar spektrofotometri uv-vis dan spektrometri massa untuk penentuan struktur senyawa organik [Buku] / penyunt. Creative Team Aura. - lampung : CV. Anugrah Utama Raharja, 2013. - Vol. No.003.

Suputri, Y. D., Ananto, A. D., & Andayani, Y. (2021). Analisis Kualitatif Kandungan Fenolik dalam Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Metanol dari Ekstrak Kulit Jagung (*Zea mays L.*). *Lambung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 2(1), 20-24.

Suryanto Edi dan Wehantouw Frenly aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak fenolik daun sukun (*Artocarpus altilis F.*) [Jurnal] // Chem. Prog. - 2009. - hal. 7.

SYFRIDIANA, R. (2017). analisis penghambatan xanthine oxidase ekstrak etanol teh hijau (*Camelia sinensis*) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis (Doctoral dissertation, University of Muhammadiyah Malang).

Tambunan Risma Marisi, Swandiny Greesty Finotory and Zaidan Sarah Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol 70% Herba Meniran (*Phyllanthus niruriL.*) Terstandar [Journal] // SAINSTECH FARMA jurnal

ilmu kefarmasian. - Jakarta Selatan : [s.n.], jui 2019. - ISSN 2086-7816 :
Vol. 12. No 2. - pp. 60-64.

Tari Mayang, Alta Ulik dan Indriani Onny penetapan kadar flavonoid secara spektrofotometri visibel pada daun jambu biji dengan perbedaan suhu pengeringan simplisia [Jurnal] // Aisyiyah medika. - Palembang : [s.n.], februari 2022. - Vol. 7 no 1.

Tejowati, H. Z. P. (2021). Penetapan Aktivitas Antioksidan Tumbuhan Paku Dikabupaten Jombang Dengan Menggunakan Metode DPPH.

Utami Ratri Retno [et al.] Aktivitas Antioksidan Kulit Biji kakao dari hasil penyaringan biji kakao kering pada derajat ringan, sedang dan berat [Jurnal]. - Yogyakarta : AGRITECH, februari 2017. - ISSN 0216-0455 (Print), ISSN 2527-3825 (Online) : Vol. 37. - hal. 1-7.

Warono, D. dan Syamsudin. (2013). *Unjuk Kerja Spektrofotometer Untuk Analisa Zat Aktif Ketoprofen*. Konversi. 995:57–65

Yuslianti Euis Reni pengantar radikal bebas dan antioksidan [Buku]. - yogyakarta : Grup penerbitan CV BUDI UTAMA, 2017. - Vol. 1.

DAFTAR LAMPIRAN

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

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

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 27 Januari 2022
 Ka. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu



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

Lampiran 2. Proses Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat

Serbuk simplisia



Perendaman serbuk simplisia



Penguapan



Fraksinasi



Lampiran 3. Perhitungan Hasil Rendemen

Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol dan Fraksi etil asetat Kulit Buah Kakao

➤ **Diketahui**

- Berat serbuk simplisia : 500 gram
- Bobot ekstrak : 56,73 gram

➤ **Rendemen Ektrak Etanol Kulit Buah Kakao**

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100 \% \\
 &= \frac{56,73 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \% \\
 &= 11,34 \%
 \end{aligned}$$

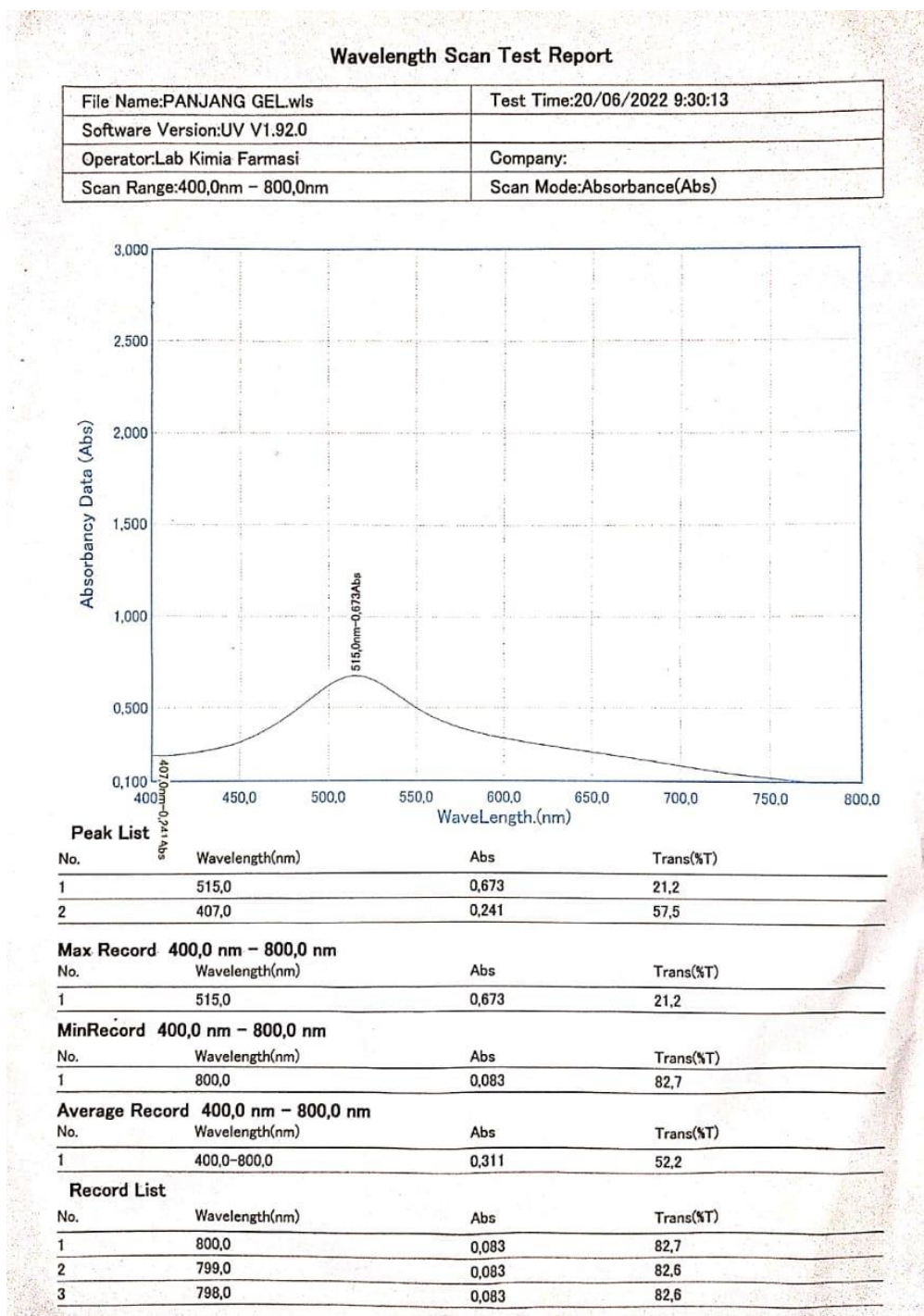
➤ **Rendemen Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao**

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{bobot fraksi etil asetat kulit buah kakao}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100 \% \\
 &= \frac{18,25 \text{ gram}}{52,73 \text{ gram}} \times 100 \% \\
 &= 32,16 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. Skrining Fitokimia

Pengujian	Gambar	Hasil
Tanin		Terdapat warna biru kehitaman
Flavonoid		Terjadi warna coklat kekuningan
Fenol		Terjadi perubahan warna biru hitam
Alkaloid		Terdapat endapan warna kuning menyala

Lampiran 5. Optimasi Panjang Gelombang



Lampiran 6. Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

INKUBASI	KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI	IC50
BLANKO	0,612			
MENIT 10	0,1	0,430	29,74	5,167
	0,4	0,393	35,78	
	0,9	0,39	36,27	
	1,6	0,378	38,24	
	2,5	0,368	39,87	
MENIT 20	0,1	0,382	37,58	5,503
	0,4	0,374	38,89	
	0,9	0,36	41,18	
	1,6	0,358	41,50	
	2,5	0,348	43,14	
MENIT 30	0,1	0,388	36,60	2,643
	0,4	0,378	38,24	
	0,9	0,362	40,85	
	1,6	0,337	44,93	
	2,5	0,312	49,02	
MENIT 40	0,1	0,490	19,93	1,485
	0,4	0,359	41,34	
	0,9	0,288	52,94	
	1,6	0,273	55,39	
	2,5	0,268	56,21	
MENIT 50	0,1	0,390	36,27	1,294
	0,4	0,352	42,48	
	0,9	0,311	49,18	
	1,6	0,298	51,31	
	2,5	0,236	61,44	
MENIT 60	0,1	0,398	34,97	1,890
	0,4	0,335	45,26	
	0,9	0,33	46,08	
	1,6	0,305	50,16	
	2,5	0,298	51,31	

MENIT	R2
10	0,7495
20	0,8996
30	0,9979
40	0,6276
50	0,9509
60	0,7101

Lampiran 7. Optimasi Waktu Inkubasi Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao

INKUBASI	KONSENTRASI	ABS	%INHIBIS	IC50
BLANKO	0,818			
MENIT 10	3,12	0,505	38,264	165,16
	12,5	0,495	39,487	
	28,12	0,485	40,709	
	50	0,475	41,932	
	78,12	0,46	43,765	
MENIT 20	3,12	0,496	39,364	139,35
	12,5	0,49	40,098	
	28,12	0,472	42,298	
	50	0,462	43,521	
	78,12	0,45	44,988	
MENIT 30	3,12	0,469	42,665	117,73
	12,5	0,46	43,765	
	28,12	0,452	44,743	
	50	0,44	46,210	
	78,12	0,431	47,311	
MENIT 40	3,12	0,45	44,988	74,52
	12,5	0,437	46,577	
	28,12	0,426	47,922	
	50	0,42	48,655	
	78,12	0,41	49,878	
MENIT 50	3,12	0,487	40,465	101,18
	12,5	0,475	41,932	
	28,12	0,458	44,010	
	50	0,446	45,477	
	78,12	0,429	47,555	
MENIT 60	3,12	0,495	39,487	97,79
	12,5	0,485	40,709	
	28,12	0,47	42,543	
	50	0,45	44,988	
	78,12	0,428	47,677	

MENIT	R2
10	0,9838
20	0,9573
30	0,9722
40	0,9127
50	0,9702
60	0,9971

Lampiran 8. Perhitungan Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH

$$\text{Ppm} = \frac{x (\text{berat bahan})}{v (\text{volume yang akan dibuat})} \times 1000$$

$$50 \text{ ppm} = \frac{x}{20 \text{ ml}} \times 1000$$

$$x = \frac{50 \text{ ppm}}{1000} \times 20 \text{ ml} = 1 \text{ mg} = 0,001 \text{ g}$$

2. pembuatan Larutan Uji Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao

a. Pembuatan Larutan Induk Fraksi Etil Asetat Kulit Buah

Kakao

- Fraksi etil asetat = 10 mg
- Volume pelarut = 10 ml
- Konsentrasi larutan induk = $\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 1000$
 $= \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000$
 $= 1000 \text{ ppm}$

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

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

- 50 ppm = $\frac{50 \text{ ppm} \times 0,5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$
 $= 0,25 \text{ mL}$

$$\frac{2,5}{5 \text{ ml}} \cdot 50 \text{ ppm} = 2,5 \text{ ppm}$$

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

$$2,5 \cdot 5 \text{ ml} = x \cdot 4 \text{ ml}$$

$$x = 3,12 \text{ ppm}$$

- $100 \text{ ppm} = \frac{100 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$
 $= 0,5 \text{ mL}$

$$\frac{0,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \cdot 100 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$$

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

$$10 \cdot 5 \text{ ml} = x \cdot 4 \text{ ml}$$

$$x = 12,5 \text{ ppm}$$

- $150 \text{ ppm} = \frac{150 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$
 $= 0,75 \text{ mL}$

$$\frac{0,75 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \cdot 150 \text{ ppm} = 22,5 \text{ ppm}$$

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

$$22,5 \cdot 5 \text{ ml} = x \cdot 4 \text{ ml}$$

$$x = 28,12 \text{ ppm}$$

- $200 \text{ ppm} = \frac{200 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$
 $= 1 \text{ mL}$

$$\frac{1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \cdot 200 \text{ ppm} = 40 \text{ ppm}$$

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

$$40 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ ml} = x \cdot 4 \text{ ml}$$

$$x = 50 \text{ ppm}$$

- $250 \text{ ppm} = \frac{250 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$

$$= 1,25 \text{ mL}$$

$$\frac{1,25 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \cdot 250 \text{ ppm} = 62,5 \text{ ppm}$$

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

$$62,5 \cdot 5 \text{ ml} = x \cdot 4 \text{ ml}$$

$$x = 78,12 \text{ ppm}$$

3. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

a. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin 100 ppm

$$\text{Ppm} = \frac{x (\text{berat bahan})}{v (\text{volume yang akan dibuat})} \times 1000$$

$$100 \text{ ppm} = \frac{x}{20 \text{ mL}} \times 1000$$

$$X = \frac{100 \text{ ppm}}{1000} \times 20 \text{ mL} = 2 \text{ mg} = 0,002 \text{ g}$$

b. Pengenceran Seri Konsentrasi Kuersetin

- Pengenceran Kuersetin 2 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 2 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{2 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mL} = 0,2 \text{ mL}$$

$$\frac{0,2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \cdot 2 \text{ ppm} = 0,04 \text{ ppm}$$

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

$$0,04 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml} = M_2 \cdot 4 \text{ ml}$$

$$= 0,1 \text{ ppm}$$

- Pengenceran Kuersetin 4 ppm

$$V_1 = \frac{4 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mL} = 0,4 \text{ mL}$$

$$\frac{0,4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \cdot 4 \text{ ppm} = 0,16 \text{ ppm}$$

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

$$0,16 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml} = M_2 \cdot 4 \text{ ml}$$

$$= 0,4 \text{ ppm}$$

- Pengenceran Kuersetin 6 ppm

$$V_1 = \frac{6 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mL} = 0,6 \text{ mL}$$

$$\frac{0,6 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \cdot 6 \text{ ppm} = 0,36 \text{ ppm}$$

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

$$0,36 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml} = M_2 \cdot 4 \text{ ml}$$

$$= 0,9 \text{ ppm}$$

- Pengenceran Kuersetin 8 ppm

$$V_1 = \frac{8 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mL} = 0,8 \text{ mL}$$

$$\frac{0,8 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \cdot 8 \text{ ppm} = 0,64 \text{ ppm}$$

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

$$0,64 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml} = M_2 \cdot 4 \text{ ml}$$

$$= 1,6 \text{ ppm}$$

- Pengenceran Kuersetin 10 ppm

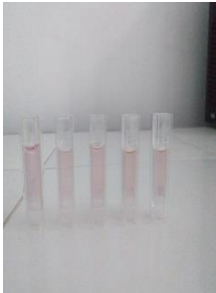
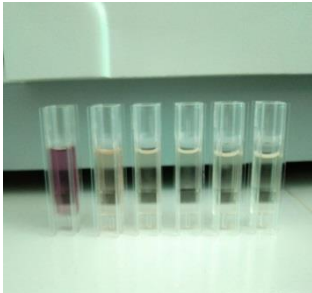
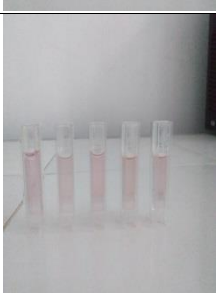
$$V_1 = \frac{10 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mL} = 1 \text{ mL}$$

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \cdot 10 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$$

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

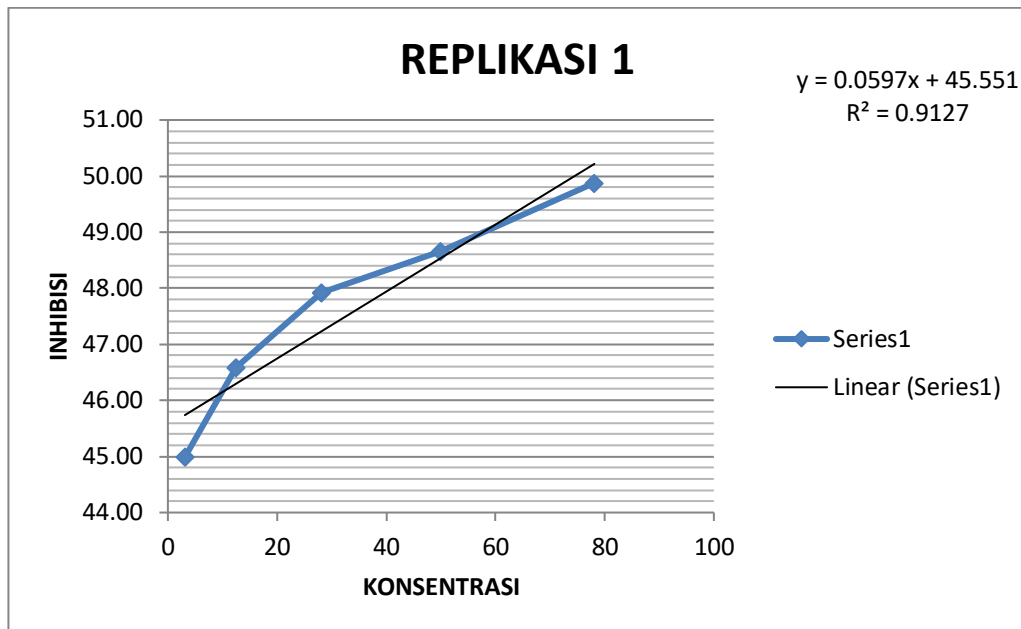
$$\begin{aligned} 1 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml} &= M_2 \cdot 4 \text{ ml} \\ &= 1 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Lampiran 9. Dokumentasi Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Kakao		Pengukuran Aktivitas Antioksidan Kuersetin	
Replikasi 1		Replikasi 1	
Replikasi 2		Replikasi 2	
Replikasi 3		Replikasi 3	

Lampiran 10. Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC50 Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao

Replikasi 1



50 % peredaman

Persamaan linier

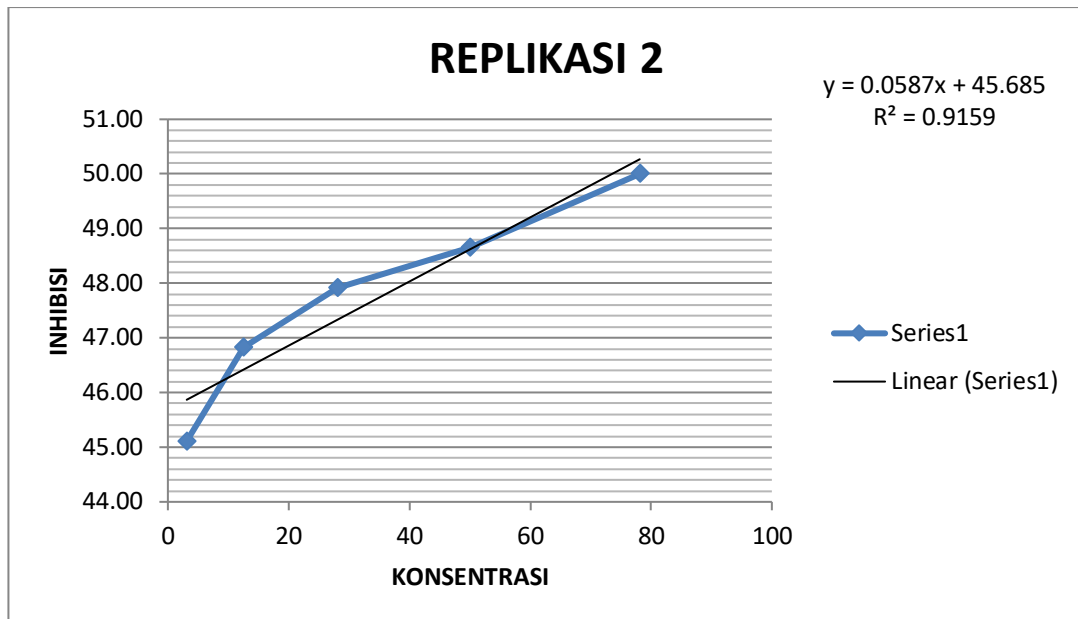
$$y = bx + a$$

$$50 = 0,0597x + 45,551$$

$$x = 71,414 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 71,414 \mu\text{g/mL (kuat)}$$

Replikasi 2



50 % peredaman

Persemaan linier

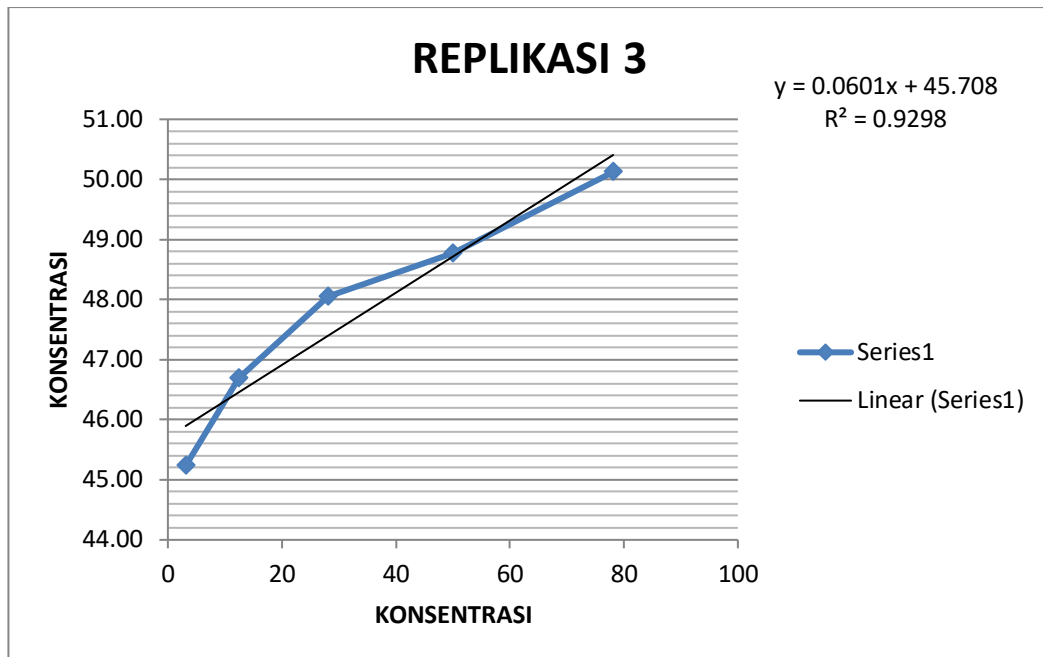
$$y = bx + a$$

$$50 = 0,0587x + 45,685$$

$$x = 73,509 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 73,509 \mu\text{g/mL (kuat)}$$

Replikasi 3



50 % peredaman

Persemaan linier

$$y = bx + a$$

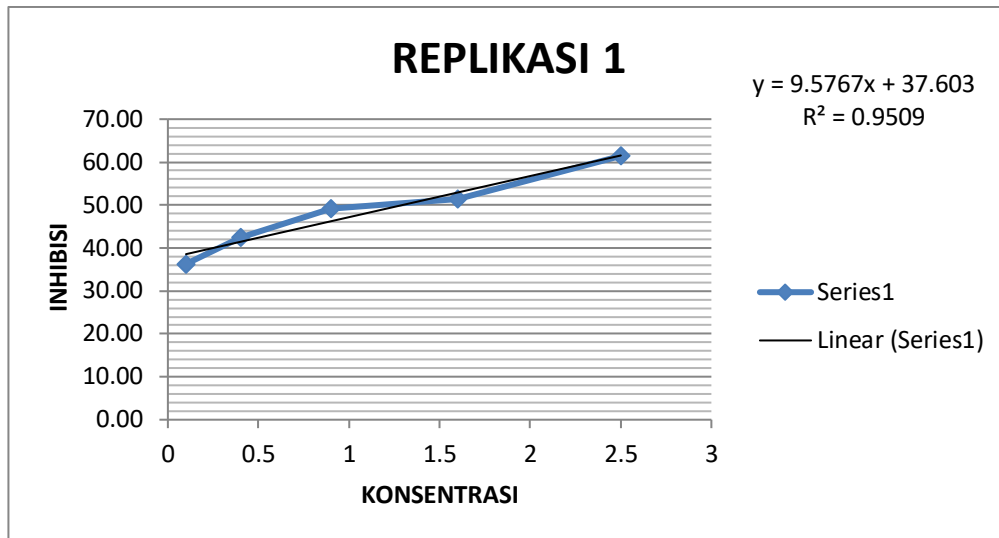
$$50 = 0,0601x + 45,708$$

$$x = 74,523 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 74,523 \mu\text{g/mL (kuat)}$$

Lampiran 11. Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC50 Kuersetin

Replikasi 1



50 % peredaman

Persamaan linier

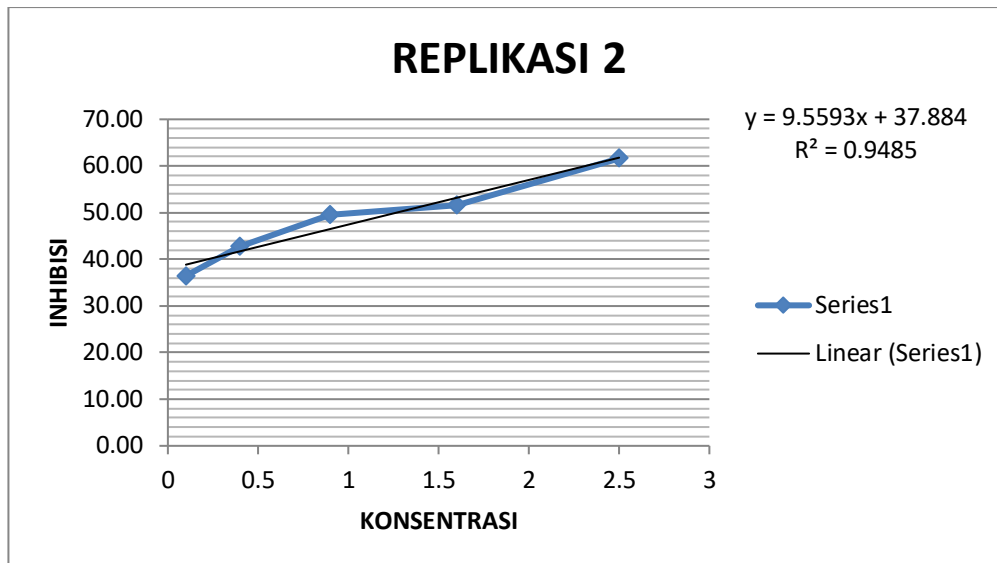
$$y = bx + a$$

$$50 = 9,5767x + 37,603$$

$$x = 1,294 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 1,294 \mu\text{g/mL (sangat kuat)}$$

Replikasi 2



50 % peredaman

Persemaan linier

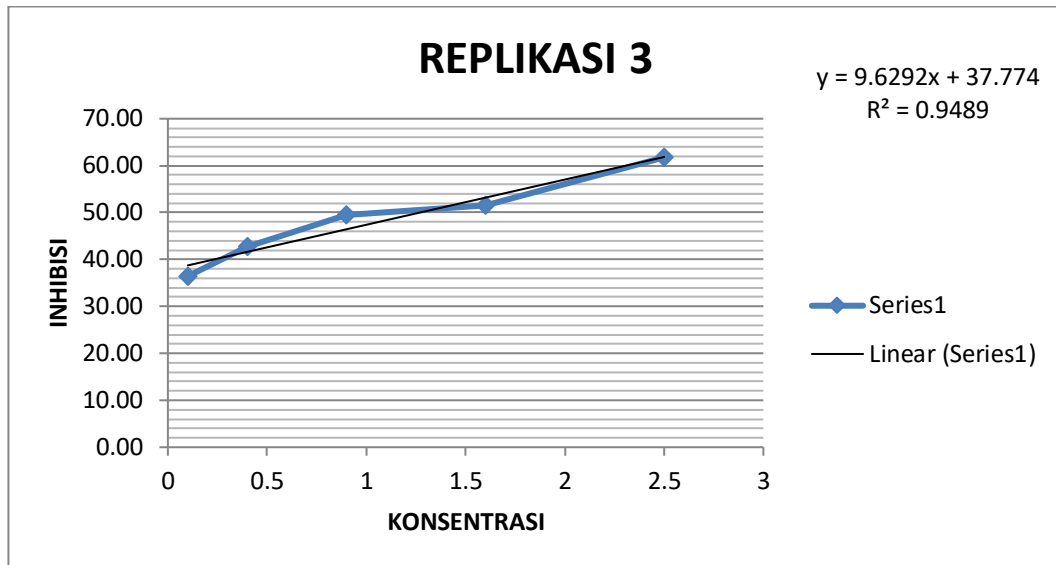
$$y = bx + a$$

$$50 = 9,5593x + 37,884$$

$$x = 1,267 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 1,267 \mu\text{g/mL (sangat kuat)}$$

Replikasi 3



50 % peredaman

Persemaan linier

$$y = bx + a$$

$$50 = 9,6292x + 37,774$$

$$x = 1,270 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{IC}_{50} = 1,270 \mu\text{g/mL (sangat kuat)}$$