

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL
KEPING BIJI COKLAT (*Theobroma cacao* L.) DENGAN
METODE DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil)**

SKRIPSI



**Oleh :
Aden Priyo Wicaksana
NIM 18040003**

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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL
KEPING BIJI COKLAT (*Theobroma cacao* L.) DENGAN
METODE DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil*)**

SKRIPSI

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



Oleh :
Aden Priyo Wicaksana
NIM 18040003

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

LEMBAR PERSETUJUAN

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

Jember, 9 Agustus 2022

Pembimbing Utama,



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

NIDN. 0703068903

Pembimbing Anggota,



Arief Judi Susilo, S.Kep., M.Kes

NIK. 196512179890031001

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat (*Theobroma Cacao* L.) Dengan Metode Dpph (*1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil*)” telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Hari : Jum'at
Tanggal : 19 Agustus 2022
Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi
Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji
Ketua Penguji,



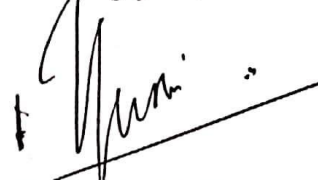
apt. Sholihatil Hidayati, M. Farm
NIDN. 0509088601

Penguji II,



apt. Lindawati Setyaningrum, M. Farm
NIDN. 0703068903

Penguji III,



Arief Judi Susilo, S.Kep., M.Kes
NIK. 196512179890031001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr. Soebandi



Helmi Nurul Huda, S. Kep., Ns., M. Kep
NIDN. 0706109104

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Aden Priyo Wicaksana
NIM : 18040003
Program Studi : Sarjana Farmasi

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

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi/laporan tugas akhir ini adalah karya orang lain atau ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam skripsi/laporan tugas akhir ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jember, 8 September 2022

Yang menyatakan,



(Aden Priyo Wicaksana)

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL KEPING BIJI COKLAT (*Theobroma cacao* L.) DENGAN METODE DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil*)

Oleh:

Aden Priyo Wicaksana
NIM. 18040003

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Lindawati Setyaningrum, M.Farm., Apt
Dosen Pembimbing Anggota : Arief Judi Susilo, S.Kep., M.Kes

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dengan sepenuh hati saya persembahkan kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan 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 dua orang hebat dalam hidup saya, Papa dan Mama. 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. Aku 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 para teman saya untuk bantuan dan kerja samanya selama ini yang sudah membantu penyelesaian tugas akhir. Buat tim penelitian Dwi, Dhea, Naufal dan tidak lupa untuk teman-teman kontrakan dan volly yang bisa membuat ku senang dan semangat di saat penyelesaian tugas akhir.
6. Teman-teman angkatan 2018 Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember
7. Almamater Universitas dr. Soebandi Jember.

MOTTO

“Barang siapa keluar untuk mencari sebuah ilmu, maka ia akan berada di jalan Allah hingga ia kembali.”

HR Tirmidzi

“Ketika dunia jahat kepadamu, maka berusahalah untuk menghadapinya, karena tidak ada orang yang membantumu jika kau tidak berusaha”

Roronoa Zoro

“Hidup ini seperti pensil yang lama lama akan habis, tetapi akan meninggalkan tulisan yang indah dalam kehidupan”

Nami

"Setiap kamu bertemu orang baru, jangan lupa selalu kosongkan gelasmu."

Bob Sadimo

"Rahasia untuk maju adalah memulai."

Mark Twain

“Kesuksesan bukanlah kunci dari kebahagiaan. Sebaliknya kebahagiaan adalah kunci dari kesuksesan.”

Bob Dylan

ABSTRAK

Wicaksana, Aden Priyo* Setyaningrum, Linda** Susilo, Arief Judi***.2022. **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil).** Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang: Keping Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) berasal dari famili *Sterculiaceae* merupakan salah satu tumbuhan di Indonesia yang digunakan secara luas oleh masyarakat sebagai bahan makanan dan minuman. Tumbuhan ini mengandung senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan yang bisa mengatasi penyakit degeneratif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak metanol Keping Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) dengan metode DPPH (1,1-difenil-1-pikrilhidrazil).

Metode: Serbuk simplisia keping biji coklat diekstraksi dan diskriming. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol menggunakan metode maserasi. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-1-pikrilhidrazil) dengan pembanding kuersetin yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Analisis menggunakan analisis probit dengan menggunakan aplikasi Microsoft Excel 2013.

Hasil Penelitian: Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) menunjukkan adanya senyawa flavonoid, katekin, tanin, dan fenolik. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) menunjukkan nilai IC_{50} rata-rata 8,25 $\mu\text{g/mL}$ dan pembanding kuersetin nilai IC_{50} rata-rata 5,48 $\mu\text{g/mL}$.

Kesimpulan: Ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori kuat sedangkan pembanding kuersetin memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat.

Kata Kunci: Keping Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.), DPPH, IC_{50}

*Peneliti

**Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Wicaksana, Aden Priyo* Setyaningrum, Linda** Susilo, Arief Judi***. 2022. ***Antioxidant Activity Test of Cocoa Chips (*Theobroma cacao* L.) Methanol Extract By DPPH Method (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hydrazil).*** Thesis. Bachelor of Pharmacy Study Program, University of dr. Soebandi.

Background: Cocoa bean chips (*Theobroma cacao* L.) from the Sterculiaceae is one of the plants in Indonesia that is widely used by the community as food and beverage ingredients. This plant contains secondary metabolites that have the potential as antioxidants that can overcome degenerative diseases. This study aims to determine the antioxidant activity of the methanol extract of Cocoa Bean Chips (*Theobroma cacao* L.) using the DPPH method (1,1-diphenyl-1-picrylhydrazil).

Methods: Cocoa bean chip simplicia powder was extracted and screened. Extraction was carried out using methanol solvent using the maceration method. The antioxidant activity test was carried out using the DPPH method (1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl) with quercetin as a comparison which was measured using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 515 nm. The analysis used probit analysis using the Microsoft Excel 2013 application.

Result: The results of phytochemical screening of the methanol extract of cocoa bean chips (*Theobroma cacao* L.) showed the presence of flavonoid compounds, catechins, tannins, and phenolics. The results of testing the antioxidant activity of the methanol extract of cocoa bean chips (*Theobroma cacao* L.) showed IC_{50} average 8,25 $\mu\text{g/mL}$ and average IC_{50} value of 5,48 $\mu\text{g/mL}$ as a comparison for quercetin.

Conclusion: The methanol extract of cocoa bean chips (*Theobroma cacao* L.) has antioxidant activity in a strong category, while quercetin has antioxidant activity in a very strong category.

Keywords: Cocoa Bean Chips (*Theobroma cacao* L.), DPPH, IC_{50}

*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 Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat (*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. Lindawati Setyaningrum, M.Farm., Apt selaku pembimbing 1
5. Arief Judi Susilo, S.Kep., M.Kes selaku pembimbing 2
6. Sholihatil Hidayati, M. Farm., Apt sebagai penguji utama

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

Jember, 8 September 2022

Penulis,

Aden Priyo Wicaksana
18040003

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
MOTTO	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5

1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat bagi Peneliti	5
1.4.2 Manfaat bagi Peneliti Lain	5
1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat	6
1.4.4 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan.....	6
1.5 Keaslian Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tanaman Coklat (<i>Theobroma cacao</i> L.)	7
2.1.1 Morfologi Tanaman	7
2.1.2 Klasifikasi.....	9
2.1.3 Kandungan Kimia.....	9
2.1.4 Penelitian Keping Biji Coklat.....	10
2.1.5 Manfaat Untuk Kesehatan.....	10
2.2 Radikal Bebas	10
2.2.1 Definisi Radikal Bebas	10
2.2.2 Sumber Radikal Bebas.....	11
2.2.3 Mekanisme Radikal Bebas	11
2.2.4 Penyakit yang ditimbulkan.....	12
2.3 Antioksidan.....	12
2.3.1. Definisi Antioksidan.....	12
2.3.2. Sumber Antioksidan	13

2.3.3. Mekanisme Antioksidan	13
2.4 Uji Aktivitas Antioksidan	14
2.4.1 DPPH.....	14
2.4.2 Tingkat Kekuatan.....	15
2.5 Tinjauan Metode Ekstraksi	16
2.5.1 Definisi.....	16
2.5.2 Jenis-jenis Ekstraksi.....	16
a. Maserasi.....	16
2.5.3 Pelarut	17
a. Metanol.....	18
2.6 Instrumen Spektrofotometer UV-VIS	18
2.6.1. Definisi Spektrofotometer UV-VIS	18
2.6.2. Jenis Spektrofotometer UV-VIS	19
2.6.3. Bagian-Bagian Spektrofotometer UV-VIS.....	20
a. Sumber cahaya	21
1. Lampu tungsten (wolfram).....	21
2. Lampu deuterium	21
b. Monokromator	21
1. Prisma.....	21
2. Grating (kisi difraksi).....	21
3. Celah optis.....	22
4. Filter	22
c. Kompartemen sampel	22

d. Detektor	23
e. Visual display.....	24
f. Sumber radiasi	24
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	26
3.1. Kerangka Konseptual.....	26
3.2. Hipotesis	27
BAB IV METODE PENELITIAN	28
4.1. Jenis Penelitian	28
4.2. Populasi	28
4.3. Sampel Penelitian.....	28
4.4. Determinasi Tanaman Coklat (<i>Theobroma cacao</i> L.)	28
4.5. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	29
4.6. Variabel Penelitian.....	29
4.6.1 Variabel Bebas	29
4.6.2 Variabel Terikat	29
4.6.3 Variabel Terkendali.....	29
4.7 Definisi Operasional.....	30
4.8 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data.....	31
4.8.1 Alat dan Bahan.....	31
a. Alat.....	31
b. Bahan.....	31
4.8.2 Teknik Pengumpulan data.....	32
a. Pembuatan simplisia keping biji coklat.....	32

b. Pembuatan ekstrak metanol keping biji coklat.....	32
c. Skrining fitokimia	32
1. Uji katein.....	32
2. Uji fenolik	32
3. Uji tanin.....	33
4. Uji flavonoid	33
d. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH	33
1. Pembuatan larutan DPPH.....	33
2. Pembuatan larutan uji ekstrak	33
3. Pembuatan larutan pembanding kuersetin	34
4. Penentuan panjang gelombang.....	34
5. Penentuan waktu inkubasi optimum	34
6. Pengukuran aktivitas antioksidan larutan uji ekstrak metanol keping biji coklat dan larutan	35
4.9 Pengolahan Data dan Analisis Data.....	35
4.10 SOP (Standar Operasional Prosedur)	36
4.10.1 Bahan dan Alat yang digunakan	36
a. Bahan.....	36
b. Alat.....	36
4.10.2 Prosedur Penelitian.....	37
a. Pembuatan simplisia.....	37
b. Pembuatan ekstrak	37
c. Skrining fitokimia	37

d. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH	37
e. Pengolahan Data.....	37
4.11 Kerangka Oprasional.....	38
BAB 5 HASIL PENELITIAN	39
5.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat...	
.....	39
5.1.1 Hasil Determinasi Tanaman.....	39
5.1.2 Ekstraksi.....	39
5.1.3 Skrining Fitokimia	39
5.2 Analisis Nilai Inhibisi Konsentrasi 50% (IC ₅₀).....	41
5.2.1 Optimasi Panjang Gelombang	41
5.2.2 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin	41
5.2.3 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak	41
5.2.4 Pengukuran Absorbansi Kuersetin Ekstrak.....	42
5.2.5 Hasil Analisis Nilai IC ₅₀ Kuersetin dan Ekstrak.....	43
BAB 6 PEMBAHASAN	45
6.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat...	
.....	45
6.1.1 Ekstraksi Keping Biji Coklat	45
6.1.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Keping Biji Coklat.....	46
6.2 Analisis Nilai Inhibisi Konsentrasi 50% (IC ₅₀).....	47
BAB 7 KESIMPULAN	52
7.1 Kesimpulan	52

7.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Peneliti	6
Tabel 2.1Tingkat kekuatan antioksidan	15
Tabel 2.2 Bahan kuvet sesuai panjang gelombang	23
Tabel 2.3 jenis-jenis detektor berdasarkan panjang gelombang	24
Tabel 2.4 Spektrum cahaya tampak dan warna komplementer.....	25
Tabel 4.1 Definisi Operasional	30
Tabel 5.1 Hasil Ekstrak Keping Biji Coklat.....	39
Tabel 5.2 Hasil Skrining Fitokimia Keping Biji Coklat	40
Tabel 5.3 Hasil Absorbansi Ekstrak.....	42
Tabel 5.4 Hasil Absorbansi Kuersetin	43
Tabel 5.4 Hasil Nilai IC50 Kuersetin dan Ekstrak.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman coklat	8
Gambar 2.2 Reaksi antara DPPH radikal dan antioksidan menjadi DPPH-H .	15
Gambar 2.3 Diagram alat spektrometercUV-Vis (single beam).....	19
Gambar 2.4 Skema Spektrofotometer UV-Vis (double beam)	20
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual	26
Gambar 4.1 Kerangka Operasional	39
Gambar 5.1 Kurva Panjang Gelombang DPPH	41
Gambar 5.2 Hasil Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Dan Kuersetin.....	42
Gambar 6.1 Mekanisme Peredaman Radikal oleh Flavonoid	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi Tumbuhan.....	60
Lampiran 2 Proses Pembuatan Ekstrak.....	61
Lampiran 3 Perhitungan Rendemen.....	62
Lampiran 4 Skrining Fitokimia.....	63
Lampiran 5 Optimasi Panjang Gelombang.....	64
Lampiran 6 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin.....	65
Lampiran 7 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak.....	66
Lampiran 8 Perhitungan Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	67
Lampiran 9 Dokumentasi Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	73
Lampiran 10 Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC_{50} Ekstrak.....	74
Lampiran 11 Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC_{50} Kuersetin.....	77
Lampiran 12 <i>Photometry Test Report</i> Ekstrak dan Kuersetin	81
Lampiran 13 Tabel Probit	82

DAFTAR SINGKATAN

1. DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
2. DPPH : *1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil*
3. IC50 : *Inhibition Concentration 50%*
4. LDL : *low density lipoprotein*
5. ROS : *reactive oxygen species*
6. UV-VIS : *Ultraviolet Visible*
7. UVA : *Ultra Violet A*

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia saat ini terjadi pergeseran epidemiologi yang menyebabkan perubahan pola penyakit yaitu meningkatnya penyakit degeneratif. Penyakit degeneratif merupakan penyakit tidak menular kronis yang disebabkan oleh penurunan fungsi organ-organ dalam tubuh akibat penuaan, seperti penyakit jantung, hipertensi, diabetes, obesitas dan lain-lain (Handajani *et al.*, 2012).

Selain itu, saat ini lingkungan sedang mengalami banyak perubahan. Misalnya, air tercemar logam berat dan udara dipenuhi asap rokok, asap mobil, dan asap industri. Polutan tersebut dapat membentuk radikal bebas (Hidayana & Kusuma, 2017).

Radikal bebas adalah molekul atau fragmen molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dalam orbital atom atau orbital molekul. Kehadiran elektron bebas ini membuat molekul sangat reaktif. Radikal bebas adalah zat antara yang terbentuk selama proses alami dalam tubuh seperti sitotoksitas, kontrol vaskular, dan neurotransmisi. Radikal bebas dapat menyerang komponen seluler yaitu protein, DNA (*deoxyribonucleic acid*), dan lipid, sehingga dapat dirusak. Sel normal melawan efek berbahaya ini melalui enzim antioksidan primer seperti superoksida dismutase dan katalase. Namun, enzim antioksidan primer dalam tubuh tidak dapat menetralkan radikal bebas bila jumlahnya melebihi kapasitas maksimum enzim tersebut (Warsi, 2017).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Hidayana and Kusuma, 2017). Antioksidan dibuat dari berbagai sumber, baik sintetis maupun alami. Sumber antioksidan alami dapat berasal dari berbagai jenis sayuran, buah-buahan, atau tanaman lain yang terdapat pada berbagai bagian tanaman yang mengandung senyawa antioksidan (Yopi *et al.*, 2017).

Tanaman berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami yang ada di Indonesia adalah biji coklat (Iflahah *et al.*, 2017). Perkebunan coklat Indonesia mengalami perkembangan yang pesat, dengan luas areal perkebunan coklat Indonesia tercatat sebesar 914.051 hektar pada tahun 2002. Perkebunan kakao sebagian besar 87,4% diusahakan oleh rakyat, sisanya 6,0% diusahakan oleh perkebunan besar negara, dan 6,7% diusahakan oleh perkebunan besar swasta. Sebagian besar varietas coklat yang dibudidayakan adalah coklat curah, dengan basis produksi utama adalah Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, dan Sulawesi Tengah. Jenis coklat bermutu tinggi juga dibudidayakan di perkebunan negara besar di Jawa bagian timur dan tengah (Tri *et al.*, 2013). Pusat penelitian kopi dan coklat Indonesia berada di Desa Nogosari Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember. Berdiri sejak 1911 dan merupakan satu-satunya lembaga penelitian kopi dan coklat di Indonesia.

Biji coklat mengandung senyawa fenolik seperti katekin, epikatekin, proanthocyanidins, asam fenolik, tanin dan flavonoid. coklat mengandung polifenol flavonoid yang berperan sebagai antioksidan, terutama katekin dan epikatekin (Sari *et al.*, 2015).

Pemanfaatan keping biji keping sebagai sumber antioksidan sangat besar. Penelitian tentang uji antioksidan keping biji coklat, sebelumnya pernah dilakukan oleh (Tri *et al.*, 2013) yaitu menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan bubuk polifenol kasar tertinggi terdapat pada sampel ukuran partikel 35 mesh yaitu sebesar 50.38% dan terendah pada sampel ukuran partikel 16 mesh yaitu sebesar 46.65%. Tingginya kandungan lemak yang tersisa pada perlakuan ukuran partikel besar yaitu 16 mesh diduga mengakibatkan nilai total polifenol rendah sehingga aktivitas antioksidannya menjadi lebih rendah juga. Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa semakin tinggi nilai total polifenolnya maka semakin besar nilai aktivitas antioksidannya.

Kemudian Penelitian yang dilakukan oleh (Iflahah *et al.*, 2017) Aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji coklat pada fraksi n-butanol masih dikatakan lemah. Tingkatan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀ (*inhibitor concentration* 50%) dengan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil*) dibagi menjadi 4. Antioksidan sangat kuat memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, antioksidan kuat memiliki nilai IC₅₀ 50-100 ppm, antioksidan sedang memiliki nilai IC₅₀ 101-150 ppm, dan antioksidan lemah memiliki nilai IC₅₀ lebih dari 150 ppm.

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut di atas, maka dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) menggunakan pelarut metanol. Penelitian ini bertujuan untuk melihat seberapa besar potensi antioksidan dari ekstrak metanol keping biji (*Theobroma cacao* L.) tersebut. Prinsip dari metode uji aktivitas antioksidan ini

adalah pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif yaitu dengan melakukan pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (ultra violet - visible) sehingga dengan demikian akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀ (Inhibitory Concentration). Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi. Prinsip kerja dari pengukuran ini adalah adanya radikal bebas stabil yaitu DPPH yang dicampurkan dengan senyawa antioksidan yang memiliki kemampuan mendonorkan hidrogen, sehingga radikal bebas dapat diredam (Ridho, 2013)

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dirumuskan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) mempunyai aktivitas antioksidan.
2. Berapa nilai inhibisi konsentrasi 50% (IC₅₀) dalam ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan dari penelitian untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) dengan metode DPPH.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Tujuan dari penelitian untuk mengidentifikasi senyawa kimia pada ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) yang menghasilkan aktivitas antioksidan.
2. Tujuan dari penelitian untuk menganalisa IC50 pada ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH.

1.4 Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan membawa beberapa manfaat. Kelebihan dari penelitian ini adalah :

1.4.1 Manfaat bagi peneliti

Dapat diketahui aktivitas antioksidan yang terkandung pada ekstrak metanol dari keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH.

1.4.2 Manfaat bagi peneliti lain

Penelitian ini memberikan informasi dan referensi yang dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut 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

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi dan pemahaman tentang kemajuan ilmu kesehatan dan alam dalam kapasitas antioksidan ekstrak metanol dari keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.).

1.4.4 Manfaat bagi ilmu pengetahuan

Penelitian ini bertujuan untuk memberikan kontribusi bagi perluasan ilmu pengetahuan tentang antioksidan, khususnya dalam ilmu farmasi, dan menjadi bahan bacaan bagi perpustakaan dan sebagai referensi bagi mahasiswa lainnya.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Penelitian	Persamaan	Perbedaan
Tri et al., 2013	a) Menggunakan metode DPPH b) Menggunakan Sampel keping biji Coklat	a) Menggunakan pelarut etanol b) Diujikan sebagai antibakteri
Yanuary, 2021	a) Menggunakan metode DPPH b) Langkah- langkah penelitian	a) Menggunakan Sampel Ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis
Iflahah et al., 2017	a) Menggunakan metode DPPH b) Menggunakan Sampel keping biji Coklat	a) Diujikan pada urin tikus b) Menggunakan pelarut etanol c) Menggunakan fraksinasi n-butanol

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Coklat (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1 Morfologi Tanaman

Coklat adalah tanaman tahunan (perennial) dan merupakan tanaman dikotil yang tumbuh 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, Trin Tanzania, Togo, Trinidad, dan Tobag idad, dan Tobago, Uganda, serta Uganda, serta Venezuela (Martono, 2013).

Menurut penelitian Martono (2013) daerah asli tanaman kakao merupakan hutan tropis dengan curah hujan dan kelembaban yang tinggi sehingga tanaman tumbuh tinggi. Batang tanaman kakao tumbuh tegak, tinggi tanaman di kebun pada umur tiga tahun dengan kisaran 1,8-3 m dan pada umur 12 tahun mencapai 4,5-7 m, sedangkan kakao yang tumbuh liar ketinggiannya mencapai 20 m. Warna daun kakao bervariasi dari kecokelatan, cokelat, cokelat kemerahan, merah kecokelatan, kemerahan, merah, merah muda, merah cerah, merah tua, dan kuning kemerahan. Daun muda berwarna kuning, kuning cerah, cokelat, merah kecokelatan, hijau kecokelatan, hijau kemerahan, dan hijau, panjang daun 10-48 cm dan lebar antara 4- 20 cm. Di samping buat memperkuat berdirinya tanaman kakao, akar tanaman ini berfungsi untuk menyerap air dan zat-zat makanan yang terlarut di dalam air dari dalam tanah serta mengangkut air dan zat-zat makanan

ke tempat-tempat yang memerlukan. Tanaman kakao mempunyai akar tunggang yang disertai dengan akar serabut dan berkembang di sekitar permukaan tanah kurang lebih sampai 30 cm. Pertumbuhan akar dapat mencapai 8 m ke arah samping dan 15 m ke arah bawah. Bunga kakao tergolong bunga sempurna terdiri dari daun kelopak (calyx) sebanyak 5 helai berwarna merah muda dan benang sari (androecium) berjumlah 10 helai. Panjang tangkai bunga tangkai bunga 2-4 cm. Warna tangkai bunga beragam dari hijau muda, hijau, kemerahan, merah muda, dan merah. Dalam keadaan normal, tanaman kakao dapat menghasilkan bunga sebanyak 6000– 10.000 per tahun dan hanya sekitar hanya sekitar 5% yang dapat menjadi buah. Buah kakao memiliki permukaan buah halus, agak halus, agak kasar, dan kasar dengan alur dangkal, sedang, dan dalam, jumlah alur sekitar 10 dengan tebal antara 1-2 cm tergantung jenis klonnya. Panjang buah 16,2– 20,50 dengan diameter 8–10,07 cm. Biji kakao dapat dibagi menjadi tiga bagian pokok, yaitu kotiledon (87,10%), kulit (12%), dan lembaga (0,9%). Biji berbentuk oval relatif pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 cm. Biji kakao diselimuti oleh lendir (pulp) berwarna putih.



Gambar 2.1 Tanaman coklat (sumber: Jefrica, 2022)

2.1.2 Klasifikasi

Menurut Jefrica (2022) tanaman coklat dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angioospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Subkelas	: Dialypetalae
Ordo	: Malvales
Familia	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao linn</i>

2.1.3 Kandungan Kimia

Biji coklat mengandung senyawa fenolik seperti katekin, epikatekin, proantosianidin, asam fenolik, tanin dan flavonoid. Kakao mengandung polifenol flavonoid yang berperan sebagai antioksidan, terutama katekin dan epikatekin (P. Sari *et al.*, 2015).

Menurut penelitian (Tri *et al.*, 2013) biji coklat mengandung senyawa polifenol cukup besar. Kandungan polifenol dalam biji coklat meliputi katekin 33-42 %, leukosianidin 23- 25 %, dan antosianin 5 %. Sedangkan pada biji coklat bubuk tanpa lemak mengandung 5-18 % senyawa polifenol. Senyawa polifenol dalam biji kakao memiliki aktivitas antioksidan yang sangat bermanfaat bagi kesehatan tubuh

2.1.4 Penelitian Keping Biji Coklat

Penelitian tentang uji antioksidan pada keping biji kakao, sebelumnya pernah dilakukan oleh Iflahah (2017) Uji aktivitas antioksidan secara in vitro dengan metode DPPH menunjukkan bahwa fraksi n-butanol memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dengan nilai IC₅₀ 170 ppm. Selain itu, penelitian yang menggunakan keping biji kakao selain pengujian antioksidan yaitu Antibakteri (Tri *et al.*, 2013).

2.1.5 Manfaat Untuk Kesehatan

Penelitian secara in vitro dan in vivo menunjukkan bahwa polifenol biji kakao mengandung antioksidan yang dapat memblokir hidrogen peroksida dan anion superoksida, melindungi lemak dari kerusakan oksidasi, bertindak sebagai antiulserik, antimikrobia, antikarsinogenik, antimutagenik, menghambat pertumbuhan tumor dan kanker, dan mengurangi penyakit-penyakit karena oksidasi low density lipoprotein (LDL) (Kattenberg, 2000; Osakabe *et al.*, 1998; Sanbogi *et al.*, 1998).

2.2 Radikal bebas

2.2.1 Definisi radikal bebas

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan membuat senyawa tersebut sangat reaktif dalam mencari pasangan, dapat dilakukan dengan cara menyerang dan mengikat elektron

yang berada disekitarnya sehingga dapat mengaktifkan timbulnya suatu penyakit (Yanuarty, 2021)

2.2.2 Sumber radikal bebas

Sumber endogen non-enzimatik ROS adalah hidrogen peroksida yang merupakan kunci reaksi Fenton. Dalam reaksi Fenton hidrogen peroksida bereaksi dengan besi atau tembaga dan membentuk radikal hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) yang merupakan ROS yang paling tidak stabil. Faktor eksogen berasal dari sumber lingkungan seperti sinar ultraviolet, obat-obatan, polusi udara dan, asap rokok. Pembentukan ROS atau radikal bebas paling banyak disebabkan UVA. Paparan UV berarti terdapat transmisi foton energik melalui lapisan kulit dan diabsorpsi molekul sel kromofor atau photosensitizer sehingga timbul efek biologik. Ultraviolet A bereaksi dengan photosensitizer atau kromofor pada kulit, seperti sitokrom, riboflavin, heme dan porfirin. Kromofor menyerap energi dari panjang gelombang UVA. Energi dilepaskan sehingga stabil dengan mentransfer molekul oksigen dan terbentuk singlet oxygen dan ROS lain. Polutan lingkungan seperti hidrokarbon aromatik polisiklik dapat diubah menjadi ROS diperantarai quinon (Andarina & Djauhari, 2017).

2.2.3 Mekanisme radikal bebas

Pembentukan radikal bebas berlangsung terus menerus di dalam tubuh manusia melalui metabolisme sel, inflamasi, nutrisi maupun radiasi sinar- γ , sinar x, UV, bahan kimia dalam makanan, obat-obatan dan polusi lingkungan bahkan makanan. Ketika radikal bebas bereaksi dengan komponen biologis (lipid, protein, dan DNA) akan menghasilkan senyawa teroksidasi dan terjadi kerusakan oksidatif

(stress oksidatif). Biasanya mekanisme pembentukan reaksi berantai radikal bebas terjadi melalui tiga tahapan reaksi yaitu, inisiasi, propagasi, dan terminasi (Labola & Puspita, 2018).

2.2.4 Penyakit yang ditimbulkan

Radikal bebas menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Beberapa kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas yaitu kerusakan DNA akibat radikal bebas yang berlebih karena terjadinya oksidasi pada salah satu basa penyusun DNA yaitu Guanosin. Guanosin yang teroksidasi akan menjadi 8-hidroksi-2-deoksi-Guanosin atau 8-OHdG. Kerusakan membran sel terjadi akibat superoksida diubah menjadi radikal hidroksil. Radikal hidroksil ini lah menyebabkan peroksidasi lemak pada membran sel mengalami kerusakan. Kerusakan protein. Terjadinya kerusakan akibat serangan radikal bebas ini termasuk oksidasi protein yang menyebabkan kerusakan jaringan tempat protein itu berada (Parwata, 2016).

2.3 Antioksidan

2.3.1 Definsi

Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas, atau suatu bahan yang berfungsi mencegah sistem biologi tubuh dari efek merugikan yang timbul dari proses ataupun reaksi menyebabkan oksidasi yang berlebihan (Paramitha, 2017). Komponen kimia antioksidan terdiri atas monohidroksil atau polihidroksil fenol (Andarina & Djauhari, 2017).

2.3.2 Sumber Antioksidan

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat dibagi menjadi 2 yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami merupakan senyawa antioksidan yang terdapat secara alami dalam tubuh sebagai mekanisme pertahanan tubuh normal maupun berasal dari asupan luar tubuh. Sedangkan antioksidan sintetis merupakan senyawa yang disintesis secara kimia. Salah satu sumber senyawa antioksidan adalah tanaman dengan kandungan senyawa polifenol yang tinggi (Tristantini *et al.*, 2016)

Antioksidan alami dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan atau buah-buahan. Beberapa contoh antioksidan alami adalah senyawa-senyawa yang terdapat dalam bahan alam/bahan makanan seperti senyawa-senyawa turunan fenol, flavonoid, vitamin C, dan vitamin E. antioksidan alami dapat ditemukan pada tumbuhan karena mengandung senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan (Agustina *et al.*, 2017).

Tanaman berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami yang ada di Indonesia adalah biji kakao (Iflahah *et al.*, 2017). Biji coklat mengandung senyawa fenolik seperti katekin, epikatekin, proanthocyanidins, asam fenolik, tanin dan flavonoid. coklat mengandung polifenol flavonoid yang berperan sebagai antioksidan, terutama katekin dan epikatekin (Osakabe *et al.*, 1998).

2.3.3 Mekanisme Antioksidan

Antioksidan melindungi sel dari kerusakan radikal bebas dengan mendonorkan satu elektron bebas ke radikal bebas atau menerima satu elektron

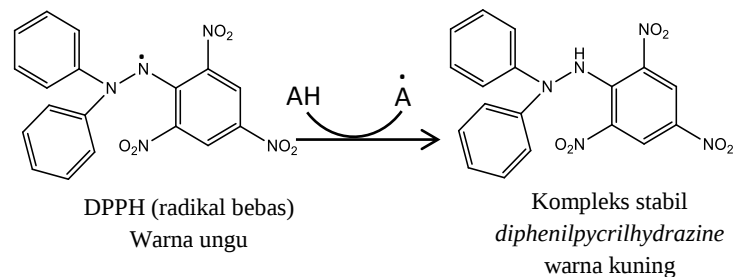
yang tidak stabil sehingga menjadi stabil dan menghentikan reaksi rantai serta mencegah kerusakan lipid, protein dan DNA (Andarina & Djauhari, 2017).

Antioksidan bekerja pada beberapa cara berbeda terhadap proses oksidatif yaitu scavenging radikal bebas secara enzimatis atau dengan reaksi kimia langsung, scavenging radikal lipid peroksil, berikatan dengan ion logam dan memperbaiki kerusakan oksidatif. Antioksidan berfungsi menambahkan atau menghilangkan satu elektron untuk menetralkan ROS, sehingga radikal bebas menjadi stabil dan menghambat proses oksidasi (Andarina & Djauhari, 2017).

2.4 Uji Aktivitas Antioksidan

2.4.1 DPPH

Uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) telah digunakan secara luas pada penelitian fitokimia untuk menguji aktivitas penangkap radikal dari ekstrak atau senyawa murni. DPPH adalah suatu radikal stabil yang mengandung nitrogen organik, berwarna ungu gelap dengan absorbansi yang kuat pada λ maks 517 nm. Keberadaan sebuah antioksidan yang dapat menyumbangkan elektron kepada DPPH, menghasilkan warna kuning yang merupakan ciri spesifik dari reaksi radikal DPPH. Setelah bereaksi dengan antioksidan warna larutan akan berkurang dan berubah menjadi kuning. Perubahan warna ini dapat diukur secara spektrofotometri dan diplotkan terhadap konsentrasi.



Gambar 2.2 Reaksi antara DPPH radikal dan antioksidan menjadi DPPH-H

2.4.2 Tingkat Kekuatan

Nilai IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji ($\mu\text{g/ml}$) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu meredam proses oksidasi DPPH sebesar 50%). Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi ($Y=AX+B$) dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai kordinatnya (sumbu Y). Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan IC₅₀ masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang diperoleh sebagai IC₅₀.

Tabel 2.1 Tingkat Kekuatan IC₅₀ (Nasution, Putri Adaria, Batubara Ridwanti, 2015)

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

2.5 Tinjauan Metode Ekstraksi

2.5.1 Definisi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Secara garis besar, proses pemisahan secara ekstraksi terdiri dari tiga langkah dasar yang pertama penambahan sejumlah massa pelarut untuk dikontakkan dengan sampel, biasanya melalui proses difusi, yang ke dua zat terlarut akan terpisah dari sampel dan larut oleh pelarut membentuk fase ekstrak, dan yang ke tiga pemisahan fase ekstrak dengan sampel (Romadhoni, 2017).

Proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan menurut Mukhriani (2014) adalah sebagai berikut :

1. Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, bunga, dll), pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan.
2. Pemilihan pelarut
3. Pelarut polar: air, etanol, metanol, dan sebagainya.
4. Pelarut semipolar: etil asetat, diklorometan, dan sebagainya.
5. Pelarut nonpolar: n-heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya.

2.5.2 Jenis-jenis ekstraksi

Jenis-jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah sebagai berikut :

a. Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini

dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014).

2.5.3 Pelarut

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair atau gas, yang menghasilkan sebuah larutan. Pelarut paling umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga umum digunakan adalah bahan kimia organik (mengandung karbon) yang juga disebut pelarut organik. Pelarut biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar (Romadhoni, 2017).

Jenis pelarut dibagi menjadi 4. Pelarut Amfiprotik mempunyai baik sifat asam maupun basa seperti halnya air. Sebagian, seperti metanol dan etanol, memiliki sifat asam-basa yang mirip dengan air dan bersama dengan air, disebut pelarut netral. Lainnya, yang disebut pelarut asam, seperti asam asetat, asam

format , asam sulfat, dan asam klorida adalah asam – asam yang jauh lebih kuat dan basa – basa yang jauh lebih lemah daripada air. Pelarut basa seperti amonia cair dan etilendiamina mempunyai kebasaan yang lebih besar dan keasaman yang lebih kecil daripada air (Romadhoni, 2017).

a. Metanol

Pada penelitian ini menggunakan metanol sebagai pelarut ekstraksi. Metanol sendiri merupakan suatu senyawa yang memiliki struktur molekul CH_3OH , bersifat polar karena memiliki gugus hidroksil ($-\text{OH}$) dan juga bersifat non-polar karena memiliki gugus metil ($-\text{CH}_3$). Walaupun demikian, metanol merupakan senyawa bersifat sangat polar (Ramdani *et al.*, 2017).

2.6 Instrumen Spektrofotometer UV-VIS

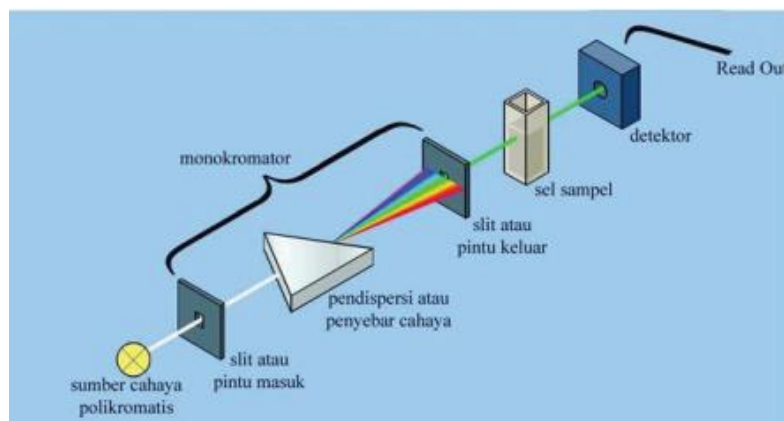
2.6.1 Definisi Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu jenis spektroskopi yang sering digunakan dalam analisis kimia dan biologi. Spektrofotometer ini didasarkan pada interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Apabila seberkas radiasi (cahaya) dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya diserap oleh molekul – molekul sesuai dengan struktur dari molekul. Setiap senyawa dalam sampel memiliki tingkatan tenaga yang spesifik. Bila cahaya mempunyai perbedaan energi antara tingkatan dasar dan tingkatan tereksitasi yang mengenai cuplikan, maka elektron – elektron pada tingkatan dasar akan dieksitasi ke tingkatan tereksitasi, dan sebagian energi cahaya yang sesuai diserap dengan panjang gelombang ini. Elektron yang tereksitasikan melepaskan

tenaga melalui proses radiasi panas dan akan kembali pada tingkatan dasar lagi. Perbedaan energi antara tingkat dasar dengan tingkat tereksitasi yang spesifik untuk tiap – tiap bahan/senyawa menyebabkan frekuensi yang diserap juga berbeda – beda (Wahyuni, 2015).

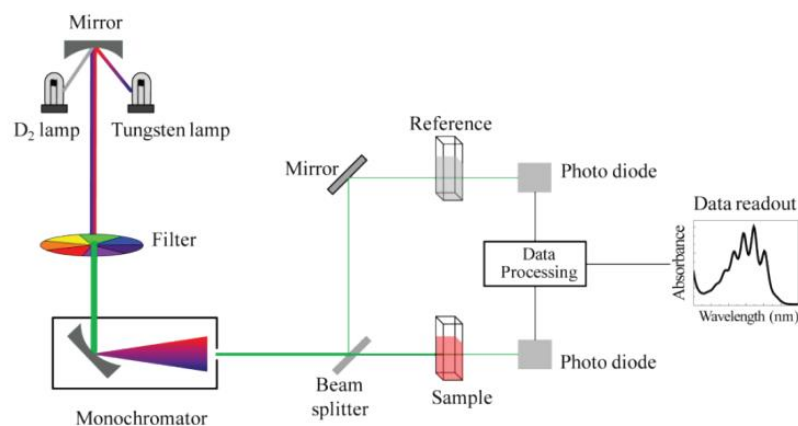
2.6.2 Jenis Spektrofotometer UV-Vis

Pada umumnya terdapat dua tipe instrumen spektrofotometer, yaitu single-beam dan double-beam. Single-beam instrument Gambar (2.3), dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Single-beam instrument mempunyai beberapa keuntungan yaitu sederhana, harganya murah, dan mengurangi biaya yang ada merupakan keuntungan yang nyata. Beberapa instrumen menghasilkan single-beam instrument untuk pengukuran sinar ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang paling rendah adalah 190 sampai 210 nm dan paling tinggi adalah 800 sampai 1000 nm. Doublebeam dibuat untuk digunakan pada panjang gelombang 190 sampai 750 nm (Suhartati, 2017).



Gambar 2.3 Diagram alat spektrometer UV-Vis (single beam)

Double-beam instrument (Gambar 2.4) mempunyai dua sinar yang dibentuk oleh potongan cermin yang berbentuk V yang disebut pemecah sinar. Sinar pertama melewati larutan blanko dan sinar kedua secara serentak melewati sampel. 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 diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik (Suhartati, 2017). Diagram spektrofotometer UV-Vis (Double-beam) dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2.4 Skema spektrofotometer UV-Vis (Double-beam)

2.6.3 Bagian Spektrofotometer UV-Vis

Bagian-bagian menurut (Putra, 1990) spektrofotometer UV-Vis ada 5 bagian yaitu :

a. Sumber cahaya

Sumber cahaya pada spektrofotometer harus memiliki pancaran radiasi yang stabil dan intensitasnya tinggi. Sumber cahaya pada spektrofotometer UV-Vis ada dua macam :

1. Lampu Tungsten (Wolfram)

Lampu ini digunakan untuk mengukur sampel pada daerah tampak. Bentuk lampu ini mirip dengan bola lampu pijar biasa. Memiliki panjang gelombang antara 350-2200 nm. Spektrum radiasinya berupa garis lengkung. Umumnya memiliki waktu 1000jam pemakaian.

2. Lampu Deuterium

lampu ini dipakai pada panjang gelombang 190-380 nm. Spektrum energy radiasinya lurus, dan digunakan untuk mengukur sampel yang terletak pada daerah uv. Memiliki waktu 500 jam pemakaian.

b. Monokromator

Monokromator adalah alat yang akan memecah cahaya polikromatis menjadi cahaya tunggal (monokromatis) dengan komponen panjang gelombang tertentu. Bagian-bagian monokromator, yaitu :

1. Prisma

Prisma akan mendispersikan radiasi elektromagnetik sebesar mungkin supaya di dapatkan resolusi yang baik dari radiasi polikromatis.

2. Grating (kisi difraksi)

Kisi difraksi memberi keuntungan lebih bagi proses spektroskopi. Dispersi sinar akan disebarkan merata, dengan pendispersi yang sama,

hasil dispersi akan lebih baik. Selain itu kisi difraksi dapat digunakan dalam seluruh jangkauan spektrum.

3. Celah optis

Celah ini digunakan untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diharapkan dari sumber radiasi. Apabila celah berada pada posisi yang tepat, maka radiasi akan dirotasikan melalui prisma, sehingga diperoleh panjang gelombang yang diharapkan.

4. Filter

Berfungsi untuk menyerap warna komplementer sehingga cahaya yang diteruskan merupakan cahaya berwarna yang sesuai dengan panjang gelombang yang dipilih.

c. Kompartemen sampel

Kompartemen ini digunakan sebagai tempat diletakkannya kuvet. kuvet merupakan wadah yang digunakan untuk menaruh sampel yang akan dianalisis. Pada spektrofotometer double beam, terdapat dua tempat kuvet. Satu kuvet digunakan sebagai tempat untuk menaruh sampel, sementara kuvet lain digunakan untuk menaruh blanko. Sementara pada spektrofotometer single beam, hanya terdapat satu kuvet.

Kuvet yang baik harus memenuhi beberapa syarat sebagai berikut :

- a. Permukaannya harus sejajar secara optis
- b. Tidak berwarna sehingga semua cahaya dapat di transmisikan
- c. Tidak ikut bereaksi terhadap bahan-bahan kimia
- d. Tidak rapuh

e. Bentuknya sederhana

Terdapat berbagai jenis dan bentuk kuvet pada spektrofotometer. Umumnya pada pengukuran di daerah UV, digunakan kuvet yang terbuat terbuat dari bahan kuarsa atau plexiglass. Kuvet kaca tidak dapat mengabsorbsi sinar uv, sehingga tidak digunakan pada saat pengukuran di daerah UV. Oleh karena, bahan kuvet dipilih berdasarkan daerah panjang gelombang yang digunakan. Gunanya agar dapat melewati daerah panjang gelombang yang digunakan.

- UV : fused silika, kuarsa
- Visible : gelas biasa, silika atau plastik
- IR : KBr, NaCl, IRTRAN atau kristal dari senyawa ion

Tabel 2.2 Bahan Kuvet Sesuai Panjang Gelombang

Bahan	Panjang gelombang
Silika	150-3000
Gelas	375-2000
Plastik	380-800

d. Detektor

Detektor akan menangkap sinar yang diteruskan oleh larutan. Sinar kemudian diubah menjadi sinyal listrik oleh amplifier dan dalam rekorder dan ditampilkan dalam bentuk angka-angka pada reader (komputer). Terdapat beberapa jenis detector pada spektrofotometer :

Tabel 2.3 Jenis-jenis detektor berdasarkan panjang gelombang

Jenis Detektor	λ range (nm)	Sifat pengukuran penggunaan
Phototube	150-1000	Arus listrik UV
Photomultiplier	150-1000	Arus listrik UV/Vis
Solid State	350-3000	
Thermocouple	600-20.000	Arus listrik IR
Thermistor	600-20.000	Hambatan Listrik IR

Syarat-syarat ideal sebuah detector adalah :

- Mempunyai kepekaan tinggi
- Respon konstan pada berbagai panjang gelombang
- Waktu respon cepat dan sinyal minimum tanpa radiasi
- Sinyal listrik yang dihasilkan harus sebanding dengan tenaga radiasi

e. Visual display

Merupakan system baca yang memperagakan besarnya isyarat listrik, menyatakan dalam bentuk % Transmittan maupun Absorbansi.

f. 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

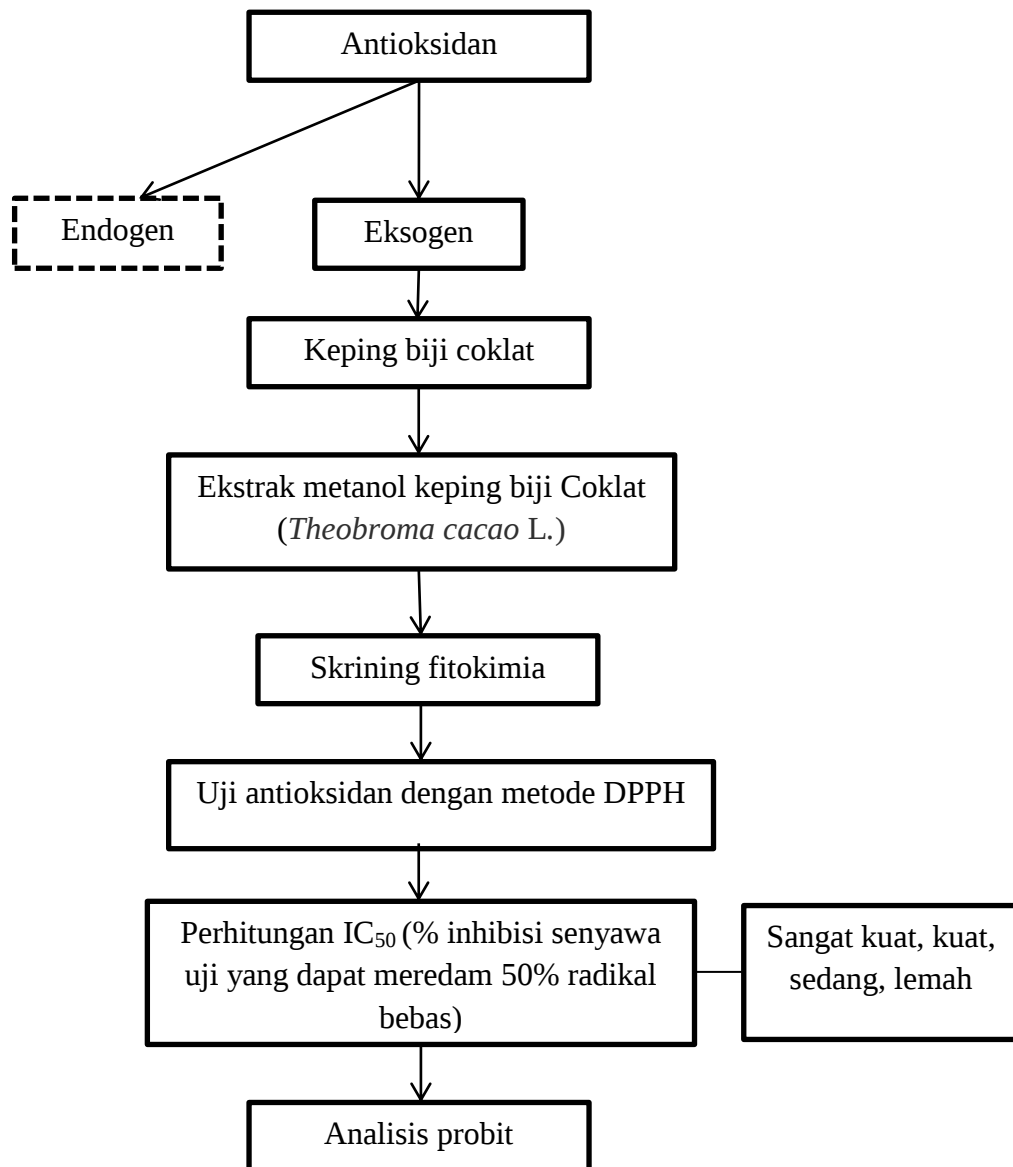
adalah lampu hidrogen atau deuterium dan lampu filamen. Lampu hidrogen digunakan untuk mendapatkan radiasi di daerah ultraviolet sampai 350 nm. Lampu filamen digunakan untuk daerah sinar tampak sampai inframerah dekat dengan panjang gelombang 350 nm sampai sekitar 250 nm (Warono, 2013).

Tabel 2.4 Spektrum cahaya tampak dan warna komplementer. Sumber: (Huang & Xu, 2010)

Puncak gelombang (nm)	Warna
393	Kuning muda
405	Kuning
427	Oranye muda
461	Merah oranye
502	Merah
518	Merah tua
536	Ungu
552	Ungu violet
572	Violet
606	Biru
646	Biru muda
738	Hijau

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

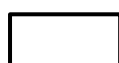
3.1 Kerangka konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konsep

Keterangan :

 : Tidak diteliti

 : Diteliti

3.2 Hipotesis

Hipotesis merupakan jawaban sementara terhadap masalah yang menjadi objek dalam penelitian. Berdasarkan kerangka konseptual diatas, maka yang menjadi hipotesisnya adalah:

H0 : Tidak terdapat aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol keping biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH.

H1 : Terdapat aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol keping biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode DPPH.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis penelitian

Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan menggunakan metode DPPH.

4.2 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas objek/subjek yang mempunyai kuantitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Susilana, 2015).

Populasi pada penelitian ini menggunakan keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) yang di dapat dari pusat penelitian kopi dan kakao, Jember, Jawa Timur.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel adalah sebagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi (Susilana, 2015). Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) yang telah dibuat berbagai macam konsentrasi (50, 100, 150, 200 dan 250 ppm).

4.4 Determinasi tanaman coklat (*Theobroma cacao* L.)

Determinasi tanaman coklat (*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 Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.6 Variabel Penelitian

4.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas atau independent (mempengaruhi) ialah variabel yang berperan memberi pengaruh kepada variabel terikat (Nasution, 2017).

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) yang digunakan.

4.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat atau dependent (terpengaruh) ialah variabel yang dijadikan sebagai faktor yang dipengaruhi oleh variabel bebas (Nasution, 2017).

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

4.6.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan sehingga antara variabel bebas dan terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang diteliti (Nasution, 2017).

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

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 ekstrak metanol keping biji coklat (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut metanol dengan metode maserasi kemudian dilakukan pengenceran menggunakan metanol p.a	Ekstrak metanol keping biji coklat (<i>Theobroma cacao</i> L.) yang diencerkan menggunakan metanol p.a sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi (50, 100, 150, 200 dan 250).	Maserator	Skala rasio	Diperoleh angka dari masing-masing konsentrasi yang telah diukur kemudian dipipet dari larutan induk dan dimasukkan kedalam larutan sampel
Aktivitas Antioksidan	Hasil dari absorbansi pada sampel keping biji coklat (<i>Theobroma cacao</i> L.) yang kemudian dihitung persen perendaman dan ditentukan konsentrasi penghambatan 50% (IC50)	Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara memipet dari masing-masing larutan uji ekstrak dengan konsentrasi (50 ppm, 100 ppm dan 150 ppm, 200	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,

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	jika yang didapat 101-150 µg/mL Lemah, jika yang didapat >150 µg/mL
---	---

4.8 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

4.8.1 Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam 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, blender, penyaring, cawan, desikator, dan stopwatch.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain keping biji coklat (*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, methanol teknis, metanol p.a, aquadest, dan senyawa DPPH, dan kuersetin, FeCl_3 1%, H_2SO_4 .

4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

a. Pembuatan ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.)

Serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi. Serbuk simplisia sebanyak 500 gram direndam dengan 1500 ml metanol selama 3 hari sambil diaduk setiap hari. Setelah 3 hari, ekstrak disaring dengan kertas saring untuk mendapatkan filtratnya. Selanjutnya dilakukan remaserasi dengan pelarut yang sama, selama 24 jam. Kemudian diuapkan atau pisahkan larutan tersebut dengan menggunakan *water bath* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak keping biji coklat yang pekat (Yanuary, 2021).

b. Skrining fitokimia

1. Uji ketekin

Uji katekin dilakukan dengan 1 mg ekstrak metanol dan ditambahkan 3 tetes larutan NaOH 10%. Hasil positif jika menunjukkan warna orange atau jingga (Rustanti *et al.*, 2013).

2. Uji fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan 5 mg ekstrak metanol ke dalam tabung reaksi, kemudian ditetesi dengan 3 tetes larutan FeCl_3 1%, hasil positif menunjukkan dari warna coklat sampai warna hitam (Lamek *et al.*, 2016).

3. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara melarutkan 1 mg ekstrak sampel kedalam metanol sampai sampel terendam seluruhnya. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif menunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman atau kehijauan (Minarno, 2015)

4. Uji flavonoid

Sebanyak 1 mg ekstrak ditambahkan ke dalam 4 mL metanol, kemudian ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 dan diaduk kuat-kuat. Sampel positif mengandung flavonoid jika warnanya sangat mencolok, yaitu warna kuning (Artini, 2008)

c. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

1. Pembuatan larutan DPPH

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode radikal bebas DPPH pada 50 ppm dibuat dengan cara melarutkan 1,25 mg kristal DPPH dalam 25 mL metanol p.a (Boy, 2019).

2. Pembuatan larutan uji ekstrak

Larutan uji ekstraksi 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg ekstrak metanol keping biji coklat dan diencerkan dengan metanol p.a sambil diaduk dan dihomogenkan, kemudian dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Larutan sampel yang telah disiapkan diencerkan dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm kemudian ditambahkan dengan metanol p.a untuk

mendapatkan beberapa konsentrasi larutan uji akhir untuk masing-masing ekstrak (Yanuary, 2021)

3. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Dibuat larutan stok 200 ppm dengan cara menimbang sebanyak 2 mg kuersetin, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sambil diaduk dan dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya 10 mL. selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm (Boy, 2019)

4. Penentuan panjang gelombang

Pipet sebanyak 200 mikroliter metanol p.a kedalam kuvet kemudian ditambahkan larutan DPPH sebanyak 3 mL homogenkan dan dibaca pada panjang gelombang 400-600 nm (Boy, 2019).

5. Penentuan waktu inkubasi optimum

Optimasi waktu inkubasi dilakukan untuk mengetahui waktu optimum saat senyawa uji bereaksi dengan senyawa DPPH. Larutan uji ekstrak dipipet sebanyak 4 mL dan direaksikan dengan larutan DPPH sebanyak 1 mL. Sampel diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum mulai menit ke-0 sampai menit ke-60 dengan selang waktu 10 menit (Hermawan *et al.*, 2018)

6. Pengukuran aktivitas antioksidan larutan uji ekstrak metanol keping biji coklat dan larutan kuersetin

Pengujian dilakukan dengan memipet 0,5 ml larutan sampel dan pembanding dari berbagai konsentrasi larutan sampel (50 ppm, 100 ppm,

150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm) dan larutan kuersetin (5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm). Kemudian masing-masing ditambahkan 3,5 ml DPPH. Kemudian diinkubasi selama waktu optimum pada ruangan gelap. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Handayani *et al.*, 2014).

4.9 Pengolahan Data dan Analisa Data

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan aplikasi Microsoft Excel dengan metode analisis probit. Analisis regresi probit merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel terikat yang bersifat kategori (kualitatif) dan variabel-variabel independen yang bersifat kualitatif maupun kuantitatif. Hasil pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV –VIS digunakan untuk menghitung persentase peredaman radikal bebas DPPH. % peredaman radikal bebas DPPH dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Peredaman} = \left[\frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \right] \times 100\%$$

Daya aktivitas antioksidan peredaman radikal bebas DPPH (persen peredaman) ekstrak metanol keping biji coklat serta kuersetin dianalisis, kemudian masing-masing dihitung dengan IC50 melalui analisis probit/ regresi linear. Rumus persamaan regresi linear yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$y = a + bx$$

Keterangan :

y = persentase peredaman

x = konsentrasi

a = intersep

b = koefisien regresi/ slope

Hasil perhitungan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan log konsentrasi ekstrak metanol keping biji coklat sebagai absis (sumbu x) dan nilai probit (aktivitas antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). Hasil analisis regresi linear berupa nilai x , dimasukkan ke dalam rumus $IC_{50} = \text{antilog } x$ dan ditentukan tingkat kekuatan antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} (Yuliani, 2015).

4.10 SOP (Standar Oprasional Prosedur)

a. Bahan dan Alat yang digunakan:

1. Bahan

Bahan yang digunakan, Simplisia yang mau diteliti antioksidannya, kertas saring, metanol teknis, metanol p.a, dan senyawa DPPH, kuersetin, $FeCl_3$ 1%, H_2SO_4 .

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain destilator, spektrofotometer, water bath, timbangan analitik, toples, maserasi, corong buchner, gelas, aluminium foil, gelas ekstrak, spatula, vial, kuvet disposabel, penyaring, cawan, desikator, dan stopwatch.

b. Prosedur penelitian**1. Pembuatan ekstrak**

Pembuatan ekstrak dilakukan berdasarkan metode maserasi secara umum, ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia ditimbang kemudian dimasukkan dalam maserator, dan ditambahkan pelarut metanol selama 3 hari, dan dilanjutkan dengan remaserasi 24 jam. Kemudian dipekatkan dengan water bath.

2. Skrining fitokimia

- Uji katekin
- Uji fenolik
- Uji tanin
- Uji flavonoid

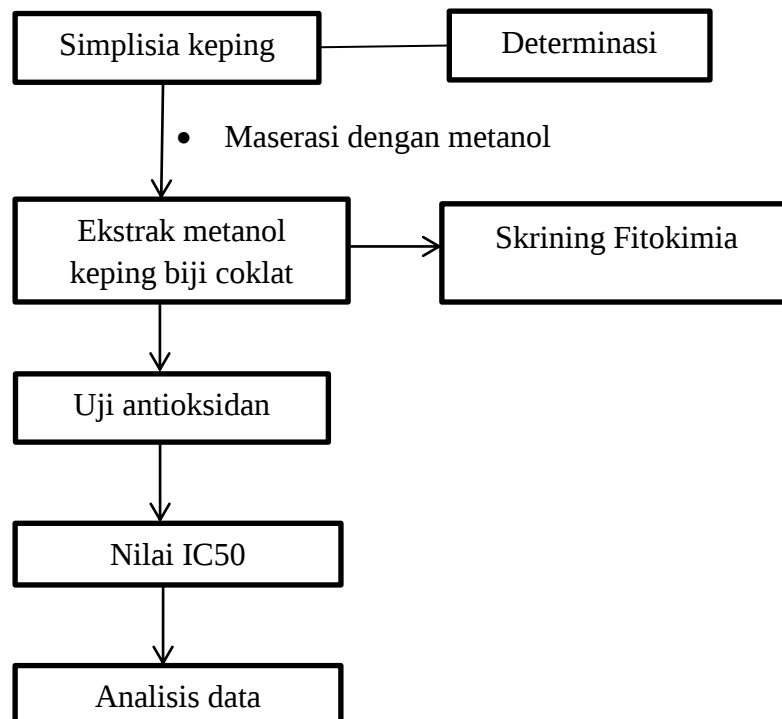
3. Pengujian aktivitas antioksidan dengan Metode DPPH

- Pembuatan larutan DPPH
- Pembuatan larutan uji ekstrak
- Pembuatan larutan pembanding
- Optimasi waktu inkubasi
- Pengukuran aktivitas antioksidan
- Perhitungan nilai IC50

4. Pengolahan data

Menggunakan Program aplikasi Microsoft Excel

4.11 Kerangka oprasional



Gambar 4.1 Kerangka Oprasiona

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat (*Theobroma Cacao* L.)

5.1.1 Hasil Determinasi Tanaman

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

5.1.2 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak metanol keping biji coklat yang diperoleh berupa ekstrak kental sebanyak 58,63 g dari 500 g serbuk keping biji coklat (rendemen 11,72%) pada tabel 5.1. Proses pembuatan ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 2 dan perhitungan hasil % rendemen dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 5.1 Hasil Ekstrak Keping Biji Coklat

Serbuk simplisia (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
500	58,63	11,72

5.1.3 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 aktivitas antioksidan. Berdasarkan data yang dihasilkan, keping biji coklat memiliki golongan senyawa flavonoid, katekin,

fenolik, dan tanin yang dapat dilihat pada tabel 5.2. Hasil dari pengujian skrining fitokimia dapat dilihat pada Lampiran 4.

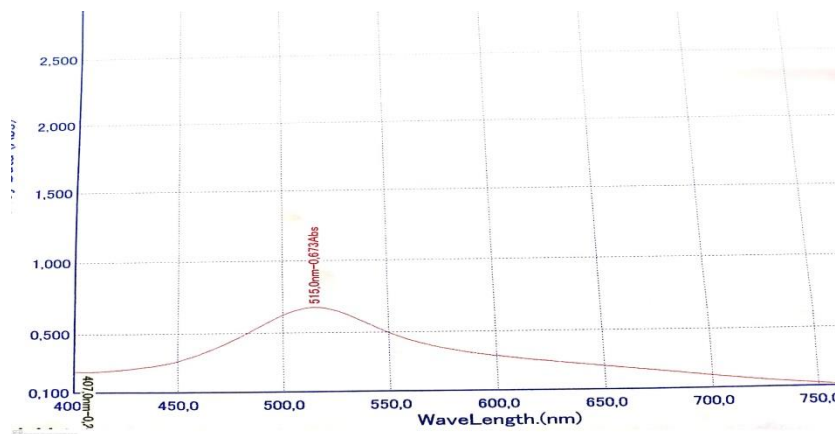
Tabel 5.2 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Keping Biji Coklat

Senyawa	Pustaka	Hasil pengamatan	Kesimpulan
Flavonoid	Sampel positif mengandung flavonoid jika warnanya sangat mencolok, yaitu warna kuning (Artini, 2008)	Terdapat warna kuning yang mencolok	Positif
Katekin	Sampel positif mengandung katekin jika warnanya orange atau jingga (Rustanti <i>et al.</i> , 2013).	Terjadi perubahan warna jingga	Positif
Fenolik	Sampel positif mengandung fenolik jika warnanya coklat sampai warna hitam (Lamek <i>et al.</i> , 2016).	Terjadi perubahan warna hitam	Positif
Tanin	Sampel positif mengandung fenolik jika warnanya biru kehitaman atau kehijauan (Minarno, 2015)	Terjadi perubahan warna hijau kehitaman	Positif

5.2 Analisis nilai inhibisi konsentrasi 50% (IC_{50})

5.2.1 Optimasi Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Serapan maksimum 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.



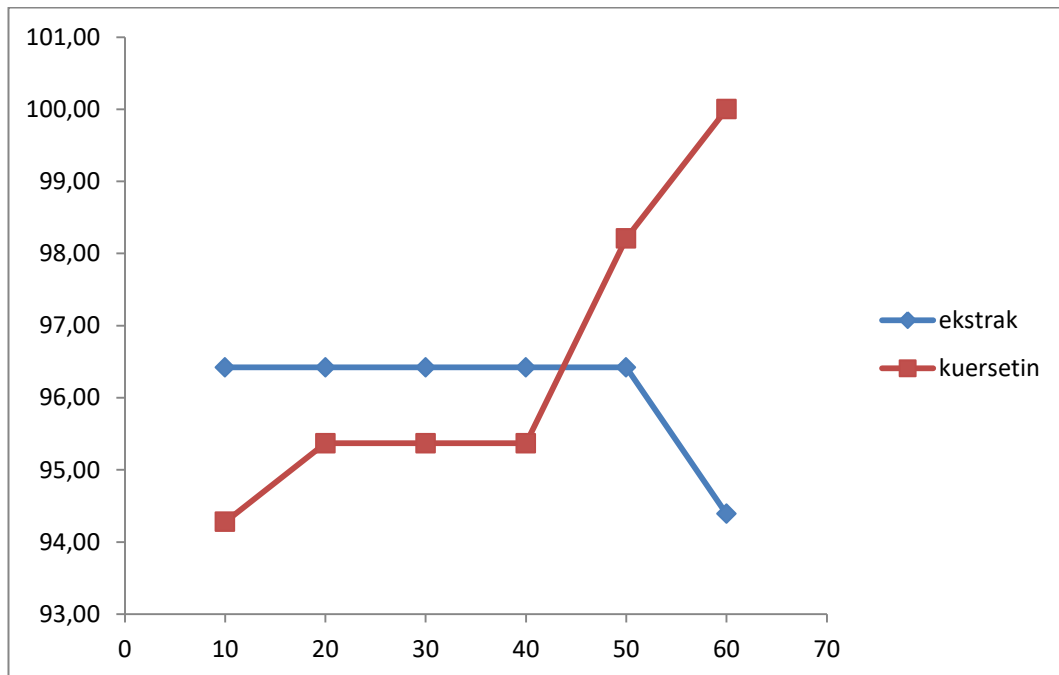
Gambar 5.1 Kurva Panjang Gelombang DPPH

5.2.2 Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

Hasil uji optimasi waktu inkubasi didapatkan waktu terbaik pada menit ke-40 dengan cara melihat nilai R^2 yang mendekati 1 dan nilai IC_{50} yang rendah. Hasil optimasi waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 5.2.

5.2.3 Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat

Hasil uji optimasi waktu inkubasi didapatkan waktu terbaik pada menit ke-50 dengan cara melihat nilai R^2 yang mendekati 1 dan nilai IC_{50} yang rendah. Hasil optimasi waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Hasil Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Dan Kuersetin

5.2.4 Pengukuran Absorbansi Kuersetin dan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat

Pengujian ekstrak metanol keping biji coklat dilakukan inkubasi selama 50 menit dan kuersetin 40 menit diukur pada panjang gelombang 515 nm sesuai dengan optimasi yang sudah dilakukan. Hasil pengujian dihitung untuk mencari % inhibisi dan probit. Hasil absorbansi ekstrak keping biji coklat dapat dilihat pada tabel 5.3 dan hasil absorbansi kuersetin dapat dilihat pada tabel 5.4

Tabel 5.3 Hasil Absorbansi Ekstrak Keping Biji Coklat

Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat					
REPLIKASI	KONSENTRASI	LOG KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI	PROBIT
BLANGKO			0,651		
R1	3,12	0,49	0,332	49,00	4,97
	12,5	1,10	0,325	50,08	5,00
	28,12	1,45	0,314	51,77	5,05
	50	1,70	0,31	52,38	5,05
	78,12	1,89	0,302	53,61	5,1
R2	3,12	0,49	0,334	48,69	4,97
	12,5	1,10	0,323	50,38	5,00
	28,12	1,45	0,317	51,31	5,03
	50	1,70	0,312	52,07	5,05
	78,12	1,89	0,304	53,30	5,08
R3	3,12	0,49	0,335	48,54	4,97
	12,5	1,10	0,32	50,84	5,03
	28,12	1,45	0,315	51,61	5,05
	50	1,70	0,308	52,69	5,08
	78,12	1,89	0,303	53,46	5,08

Tabel 5.4 Hasil Absorbansi Kuersetin

Kuersetin					
REPLIKASI	KONSENTRASI	LOG KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI	PROBIT
BLANGKO			0,638		
R1	0,63	-0,20	0,357	44,04	4,85
	2,5	0,40	0,332	47,96	4,95
	5,63	0,75	0,32	49,84	5,00
	10	1,00	0,313	50,94	5,03
	15,63	1,19	0,302	52,66	5,08
R2	0,63	-0,20	0,353	44,67	4,87
	2,5	0,40	0,323	49,37	4,97
	5,63	0,75	0,317	50,31	5,00
	10	1,00	0,312	51,10	5,03
	15,63	1,19	0,304	52,35	5,05
R3	0,63	-0,20	0,356	44,20	4,87
	2,5	0,40	0,328	48,59	4,97
	5,63	0,75	0,319	50,00	5,00
	10	1,00	0,307	51,88	5,05
	15,63	1,19	0,306	52,04	5,05

5.2.5 Hasil Analisis Nilai IC_{50} Kuersetin dan Ekstrak Keping Biji Coklat

Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan sampel dihitung sebagai persen inhibisi dan probit. Hasil perhitungan probit dimasukkan kedalam persamaan regresi dengan log konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai Probit sebagai ordinatnya (sumbu Y). Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, kuat $50 \mu\text{g/mL} - 100 \mu\text{g/mL}$, sedang $101 \mu\text{g/mL} - 150 \mu\text{g/mL}$, lemah $151 \mu\text{g/mL} - 200 \mu\text{g/mL}$ (Salim, 2018). Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Hasil analisis nilai IC_{50} ekstrak dan kuersetin dapat dilihat pada tabel 5.5

Tabel 5.5 Hasil Nilai IC_{50} Kuersetin dan Ekstrak Keping Biji Coklat

Senyawa	IC_{50} (replikasi)			$\bar{X} \pm RSD$	Kategori
	1	2	3		
Kuersetin	5,521	5,702	5,222	$5,48 \pm 4,42$	Sangat kuat
Ekstrak	8,648	9,643	6,469	$8,25 \pm 19,67$	Sangat kuat

Berdasarkan hasil nilai pengujian ekstrak metanol keping biji coklat replikasi 3 kali menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang dimiliki masuk dalam kategori kuat dengan hasil nilai rata-rata IC_{50} sebesar $8,25 \pm 19,67$. Nilai IC_{50} kuersetin sebesar $5,48 \pm 4,42$ termasuk dalam kategori sangat kuat.

BAB 6 PEMBAHASAN PENELITIAN

6.1 Identifikasi Senyawa Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat (*Theobroma Cacao* L.)

6.1.1 Ekstrak Keping Biji Coklat (*Theobroma Cacao* L.)

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman keping biji coklat yang didapatkan Puslit Kopi Dan Coklat Jember berupa serbuk coklat. Serbuk yang diperoleh kemudian dilakukan ekstraksi sebanyak 500 g menggunakan pelarut 2 L dengan menggunakan metode maserasi yang dilakukan selama 4 x 24 jam (Febrina *et al.*, 2015). Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi dengan cara merendam simplisia pada pelarut tertentu dan sesekali dilakukan pengadukan (Anjaswati *et al.*, 2021). Prinsip maserasi adalah melarutnya zat aktif berdasarkan sifat kelarutannya *dissolved like*, senyawa polar akan terlarut pada pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan terlarut pada pelarut yang bersifat non polar. Pertemuan antara simplisia dengan pelarut terdapat perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel. Perbedaan konsentrasi ini yang dapat mengakibatkan terjadinya proses difusi, dimana terjadi proses perpindahan zat dari konsentrasi yang lebih tinggi menuju konsentrasi yang lebih rendah. Peristiwa ini terjadi berulang-ulang sampai terjadi kesetimbangan konsentrasi di dalam dan luar sel (Marjoni, 2016).

Ekstrak kental keping biji coklat yang diperoleh sebanyak 58,63 g dari 500 g simplisia keping biji coklat, rendemen yang dihasilkan yaitu 11,72 %. Rendemen adalah perbandingan produk akhir yang diperoleh terhadap bahan baku

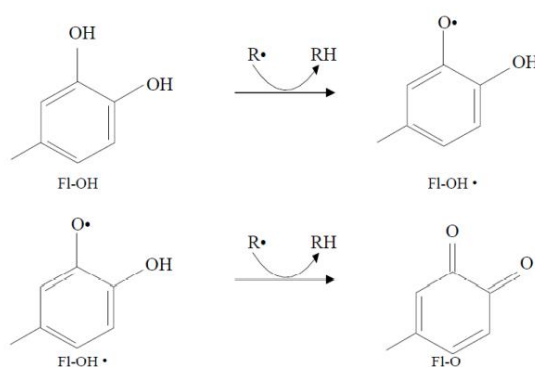
yang digunakan. Nilai rendemen yang diperoleh berdasar berat kering bahan baku. Rendemen produk berkaitan dengan metode ekstraksi dan pelarut yang dipakai untuk memisahkan senyawa kimia. Rendemen yang diperoleh dari hasil ekstraksi keping biji coklat dikatakan baik karena nilainya lebih dari 10% (Anjaswati et al., 2021).

6.1.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Keping Biji Coklat (*Theobroma Cacao* L.)

Skrining fitokimia merupakan suatu tahap awal untuk mengidentifikasi kandungan suatu senyawa dalam simplisia atau tanaman yang akan diuji. Fitokimia atau kimia tumbuhan mempelajari aneka ragam senyawa organik yang dibentuk dan ditimbun oleh tumbuhan, yaitu mengenai struktur kimianya, biosintesisnya, penyebarannya secara ilmiah serta fungsi biologinya. (Dewatisari et al., 2018) Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak keping biji coklat mengandung senyawa katekin, fenolik, tanin dan flavonoid. Hasil skrining yang telah dilakukan sesuai dengan penelitian (Sari et al., 2015) yang menyebutkan bahwa kandungan senyawa kimia seperti katekin, fenolik, tanin dan flavonoid.

Senyawa katekin memiliki gugus hidroksil lebih dari satu yang dapat mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas (Sari & Taufikurohmah, 2019). Senyawa tanin ini mempunyai kemampuan untuk menyumbangkan atom hidrogen, sehingga radikal DPPH dapat tereduksi menjadi bentuk yang lebih stabil (Sulandi, 2013). Senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak metanol keping biji coklat juga memiliki kemampuan sebagai antioksidan hal ini karena pada strukturnya terdapat gugus hidroksil yang dapat mendonorkan atom

hidrogennya kepada radikal bebas sehingga radikal senyawa fenolik dapat meredam radikal bebas (Ridho, 2013). Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena mampu mentransfer sebuah elektron kepada senyawa radikal bebas, dimana $R^\bullet$ merupakan senyawa radikal bebas, Fl-OH merupakan senyawa flavonoid sedangkan Fl-OH $^\bullet$ merupakan radikal flavonoid. Reaksi peredaman radikal bebas oleh senyawa flavonoid seperti dalam Gambar 6.1 berikut.



Gambar 6.1 Mekanisme Peredaman Radikal oleh Flavonoid (Lumbantoruan & Hidayat, 2013)

6.2 Analisis nilai inhibisi konsentrasi 50% (IC_{50})

Uji aktivitas antioksidan dalam penelitian ini menggunakan metode peredaman terhadap radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yang diujikan terhadap ekstrak metanol keping biji coklat. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan pada ekstrak tersebut dalam mereduksi radikal bebas DPPH yang dapat dilihat dari nilai IC_{50} yang diperoleh. IC_{50} adalah konsentrasi larutan uji yang mampu menghambat 50% larutan radikal

bebas DPPH (Hermawan *et al.*, 2018). Prinsip metode DPPH adalah mengurangi intensitas warna DPPH karena jumlah DPPH yang berkurang bereaksi dengan sampel menjadi DPPH-H. Penangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan menyebabkan terjadinya perubahan warna ungu dan terbentuknya kompleks difenilpikrilhidrazin berwarna kuning yang tidak radikal (Nur Azizah, 2019)

Sebelum melakukan pengujian aktivitas antioksidan terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimal. Pada penentuan panjang gelombang digunakan blanko berupa larutan DPPH. Menurut Molyneux praktek yang normal di spektrofotometri, konsentrasi DPPH awal di cuvette harus dipilih untuk memberikan absorbansi nilai kurang dari 1,0 (yang sesuai dengan cahaya Intensitas dikurangi tidak lebih dari sepuluh kali lipat dalam melewati sampel). Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam pengujian antioksidan sangat bervariasi. 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 (Salim, 2018) menunjukkan bahwa panjang gelombang DPPH maksimum adalah 515 nm dengan absorbansi 0,750. Namun berdasarkan ketentuan yang tercantum dalam Farmakope Indonesia edisi IV, batas pergeseran yang diperbolehkan sebesar 2 nm sehingga panjang gelombang serapan maksimum yang diperoleh pada penelitian ini masih masuk dalam range dan diperbolehkan untuk digunakan.

Penetapan waktu inkubasi optimum ditujukan 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 di dapat pada menit ke-50 untuk ekstrak dan menit ke-40 untuk kuersetin dapat dilihat pada Gambar 6.2. Penentuan waktu optimasi terbaik dapat ditentukan dengan mencari nilai koefisien korelasi nilai R^2 yang mendekati 1 dan nilai IC_{50} yang rendah.

Aktivitas antioksidan diuji dengan mengukur absorbansi Larutan pereaksi DPPH bereaksi dengan larutan uji (sampel/bandingkan) pada panjang gelombang maksimum. Peluruhan ungu di kotak DPPH diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Nilai penyerapan DPPH sebelum dan Setelah menambahkan larutan uji dihitung sebagai persentase peredaman dan nilai probit. Kemudian nilai IC_{50} dihitung dari regresi linier yang diperoleh.

Hasil analisis kemampuan penangkal radikal bebas ekstrak metanol keping biji coklat penggantungan tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.3 yang menunjukkan bahwa lebih lanjut Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar aktivitas pereduksi DPPH karena ada lebih banyak atom hidrogen dalam metanol keping biji coklat tersuspensi yang berpasangan dengan elektron pada radikal bebas DPPH untuk Penyerapan yang berkurang ditandai dengan pembentukan kompleks diphenylpicrylhydrazine warna kuning yang bersifat non radikal (Sulandi, 2013).

Nilai IC_{50} diperoleh berdasarkan persamaan regresi linier yang didapatkan dengan memplot konsentrasi larutan uji dan persen peredaman DPPH, dengan log konsentrasi larutan uji ($\mu\text{g/mL}$) sebagai absis dan nilai probit sebagai ordinat. Hasil persamaan regresi dapat dilihat pada Lampiran 10 dan kategori nilai IC_{50} sebagai antioksidan dapat dilihat pada tabel 5.5. Pada grafik hubungan persen

inhibisi dengan konsentrasi ekstrak metanol keping biji coklat didapatkan nilai r replikasi 1, 2, dan 3 yaitu 0,9165, 0,96, dan 0,9769. Apabila nilai r mendekati 1 maka semakin menggambarkan korelasi yang sempurna (Asadi, 2018)

Penelitian yang dilakukan oleh (Iflahah *et al.*, 2017) dengan penelitian uji aktivitas antioksidan dengan penelitian uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa fraksi n-butanol memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dengan nilai IC_{50} 170 ppm dengan kategori sedang. Perbedaan aktivitas antioksidan yang diperoleh disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya proses waktu ekstraksi dilakukan selama 24 jam sedangkan pada penelitian ini dilakukan selama 3 x 24 jam dimana semakin lama waktu maserasi yang diberikan maka semakin lama kontak antara pelarut dengan bahan yang akan memperbanyak jumlah sel yang pecah dan bahan aktif yang terlarut (Chairunnisa *et al.*, 2019) dan pelarut pada penelitian ini menggunakan pelarut metanol sedangkan penelitian Iflahah (2017) menggunakan pelarut etanol yang dimana metanol lebih sedikit polar dibandingkan etanol yang memiliki atom C yang lebih banyak (Loekitowati *et al.*, 2013).

Aktivitas antioksidan dari pembanding kuersetin dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, dan 50 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh dari hasil absorbansi menit ke- 40 pada panjang gelombang 515 nm. Analisis persen inhibisi kuersetin dapat dilihat pada tabel 5.4 bahwa kenaikan konsentrasi berbanding lurus dengan peningkatan persen peredaman. Kuersetin memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan ditunjukkan nilai IC_{50} rata-rata sebesar 5,48 $\mu\text{g/mL}$.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) adalah flavonoid, katekin, tanin, dan fenolik.
2. Nilai aktivitas antioksidan IC₅₀ dari ekstrak keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode DPPH menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat dengan IC₅₀ rata-rata $8,25 \pm 19,67$ dan hasil pengujian aktivitas antioksidan kuersetin menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat dengan IC₅₀ rata-rata $5,48 \pm 4,42$.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode yang lain untuk memperkuat hasil uji aktivitas antioksidan pada keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.).
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak metanol keping biji coklat (*Theobroma cacao* L.).
3. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan sampel tanaman coklat (*Theobroma cacao* L.) pada bagian lain untuk memperkuat hasil uji aktivitas antioksidannya.

4. Perlu dilakukan penambahan informasi terkait kemajuan ilmu kesehatan berbahan herbal terkait tanaman coklat (*Theobroma cacao* L.) sebagai senyawa antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- agustina, W., Nurhamidah, & Handayani, D. (2017). Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Beberapa Fraksi Dari Kulit Banteng Jarak (*Ricinus Communis* L.). *Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 1(2), Hlm. 117-122.
- Andarina, R., & Djauhari, T. (2017). Antioksidan Dalam Dermatologi. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 4(1), 39–48.
- Anjaswati, D., Pratimasari, D., & Nirwana, A. P. (2021). Perbandingan Rendemen Ekstrak Etanol , Fraksi N- Heksana , Etil Asetat , Dan Air Daun Bit (*Beta Vulgaris* L .) Menggunakan Fraksinasi Bertingkat. *Stikes*, 1(1), 1–6.
- Artini, P. E. U. D., & Astuti, K. W., Warditiani, N. K. (2008). *Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (Zingiber Purpureum Roxb.)*. Iii, 1–7.
- Asadi. (2018). Pengaruh Kualitas Produk Dan Promosi Terhadap Keputusan Pembelian Produk Minuman Teh “Rio”, Di Kec. Bangil Pasuruan. *Jurnal Akuntansi Dan Manajemen*, 3(3), 59–73. Jurnal.Stiegwalisongo.Ac.Id?Article?Download
- Boy, Candra. (2019). *Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kemangi (Ocimum Tenuifloruml.) Dengan Metode Dpph (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)*. 2(2), 1–8.
- Chairunnisa, S., Wartini, N. M., & Suhendra, L. (2019). Pengaruh Suhu Dan Waktu Maserasi Terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus Mauritiana* L.) Sebagai Sumber Saponin. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 7(4), 551.
- Dewatisari, W. F., Rumiyanti, L., & Rakhmawati, I. (2018). Rendemen Dan Skrining Fitokimia Pada Ekstrak Daun Sansevieria Sp. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 17(3), 197.
- Febrina, L., Rusli, R., & Muflihah, F. (2015). Optimalisasi Ekstraksi Dan Uji

- Metabolit Sekunder Tumbuhan Libo (*Ficus Variegata* Blume). *Journal Of Tropical Pharmacy And Chemistry*, 3(2), 74–81.
- Handajani, A., Betty, R., & Herti, M. (2012). *Faktor-Faktor Yang Berhubungan Dengan Pola Kematian Pada Penyakit Degeneratif Di Indonesia*. *Jurnal Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*. 13(1).
- Handayani, V., Ahmad, A. R., Sudir, M., Etlingera, P., & Sm, R. M. (2014). *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Dan Daun Patikala (Etlingera Elatior (Jack) R . M . Sm) Menggunakan Abstrak*. 86–93.
- Hermawan, H., Sari, B. L., & Nashrianto, H. (2018). Kadar Polifenol Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Dan Metanol Buah Ketapang (*Terminalia Catappa* L.). *Jurnal Online Mahasiswa (Jom) Bidang Farmasi*, 1(1), 1–8.
- Hidayana, V., & Kusuma, A. E. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Teh Kombucha Daun Coklat (*Theobroma Cacao*. L) Berdasarkan Lama Fermentasi. *Jurnal Farmasi Higea*, 9(2).
- Huang, T., & Xu, X. H. N. (2010). Synthesis And Characterization Of Tunable Rainbow Colored Colloidal Silver Nanoparticles Using Single-Nanoparticle Plasmonic Microscopy And Spectroscopy. *Journal Of Materials Chemistry*, 20(44), 9867–9876.
- Iflahah, M. A., Puspawati, N. M., Suaniti, N. M., Terapan, M. K., Udayana, P. U., Udayana, U., & Jimbaran, B. (2017). Aktivitas Antioksidan Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Dalam Menurunkan Kadar 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanosin Dalam Urin Tikus Setelah Terpapar Etanol. *Cakra Kimia*, 4(2), 113–119.
- Labola, Y. A., & Puspita, D. (2018). Peran Antioksidan Karotenoid Penangkal Radikal Bebas Penyebab Berbagai Penyakit. *Farmasetika.Com (Online)*, 2(5), 12.

- Loekitowati, P., Fahma, & Aini, A. (2003). Pengaruh Jenis Dan Volume Pelarut Terhadap Hasil Ekstraksi Bha Dan Bht Dari Minyak Goreng. In *Jurnal Penelitian Sains* (Issue 14, Pp. 7–14).
- Lubis Lamek Nasution, M Pandapotan, Simanjuntak Partomuan, M. Y. M. (2016). Uji Fenolik Dan Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Kulit Jengkol (*Archidendron Jiringa*). *Chempublish Journal*, 1(Vol 1 No 2 (2016): Chempublish Journal), 42–51.
- Lumbantoruan, E. P., & Hidayat, P. (2013). *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia Trifolia) Dengan Metode Dpph (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. 14–27.
- Minarno, E. B. (2015). Skrining Fitokimia Dan Kandungan Total Flavanoid Pada Buah *Carica Pubescens* Lenne & K. Koch Di Kawasan Bromo, Cangar, Dan Dataran Tinggi Dieng. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 5(1), 73–82.
- Mukhriani. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7.
- 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), 10–18.
- Nasution, S. (2017). Variabel Penelitian. *Raudhah*, 05(02), 1–9.
- Nur Azizah, M. (2019). *Penentuan Aktivitas Antioksidan Dan Antidiabetes Ekstrak Daun Ndok-Ndokan (Xanthophyllum Vitellinum)*.
- Paramitha, I. A. (2017). Tinjauan Pustaka Tinjauan Pustaka. *Convention Center Di Kota Tegal*, 6–37.
- Parwata, M. O. A. (2016). Bahan Ajar Antioksidan. *Kimia Terapan Program Pascasarjana Universitas Udayana*, April, 1–54.

- Ramdani, D., Majuki, Marjuki, & Chuzaemi, S. (2017). Pengaruh Perbedaan Jenis Pelarut Dalam Proses Ekstraksi Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) Pada Pakan Terhadap Viabilitas Protozoa Dan Produksi Gas In-Vitro. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 27(2), 54–62.
- Rezky Yanuarty. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Daun Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Farmasindo Politeknik Indonusa Surakarta*, Vol. 5, 53–56.
- Ridho, E. Al. (2013). *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia Trifolia) Dengan Metode Dpph (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*.
- 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-Wathoniyah Pedurungan Semarang*, 2–3.
- Rustanti, E., Jannah, A., & Fasya, A. G. (2013). Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Katekin Dari Daun Teh (*Cameliasinensis* L.Var Assamica) Terhadap Bakteri *Micrococcus luteus*. *Alchemy*, 2(2).
- Salim, R. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Infusa Daun Ungu Dengan Metoda Dpph (1,1- Diphenil- 2-Picrylhidrazil). *Jurnal Katalisator*, 3(2), 153.
- Sari, D. N., & Taufikurohmah, T. (2019). Pengaruh Penambahan Nanogold Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Gambir (*Uncaria Gambir* Roxb.). *Unesa Journal Of Chemistry*, 8(1), 20–26.
- Sari, P., Utari, E., Praptiningsih, Y., & Maryanto. (2015). Karakteristik Kimia-Sensori Dan Stabilitas Polifenol Minuman Cokelat-Rempah. *Jurnal Agroteknologi*, 09(01), 54–66.
- Suhartati, T. (2017). *Dasar-Dasar Spektrofotometri Uv-Vis Dan Spektrometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*.
- Sulandi, A. (2013). *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kloroform Buah Lakum*

(*Cayratia Trifolia*) Dengan Metode Dpph (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). 1, 81–109.

Susilana, R. (2015). Modul Populasi Dan Sampel. *Modul Praktikum*, 3–4.

Tri, Y., Kusuma, C., Suwasono, S., & Yuwanti, S. (2013). *Pemanfaatan Biji Kakao Inferior Campuran Sebagai Sumber The Utilization Of Inferior Cocoa Beans As Antioxidant And Antibacterial Sources*. 1(November), 33–37.

Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Gabriel, J. (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode Dpph Pada Daun Tanjung (*Mimusops Elengi* L). *Universitas Indonesia*, 2.

Wahyuni, I. R. (2015). *Validasi Metode Analisis Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Nheksan, Etil Asetat, Etanol 70% Umbi Talas Ungu (Colocasia Esculenta L. Schott) Dengan Metode Dpph, Cuprac Dan Frap Secara Spektrofotometri Uv-Vis*.

Warono, D. S. (3013). *Unjuk Kerja Spektrofotometer Untuk Analisa Zat Aktif Ketoprofen*. 2, 57–65.

Warsi. (2017). *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia Vol. 4 No. 2 Desember 2017* 67. 4(2), 67–73.

Yopi, R., Hasanah, M., & Amaliani, S. (2017). Analisis Antioksidan Dari Berbagai Fraksi Daun Cokelat (*Theobroma Cacao* L.). *Jurnal Ilmiah Bakti Farmasi*, 1, 33–40.

Yuliani, N. N. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Infusa Daun Kelor (*Info Kesehatan*, 14).

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

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

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:

Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.



Jember, 27 Januari 2022
 Ka. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu
 Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM
 NIP. 197106212001121001

Lampiran 2. Proses Pembuatan Ekstrak

Perendaman serbuk simplisia



Penguapan ekstrak



Ekstrak kental keping biji coklat



Lampiran 3. Perhitungan Rendemen

Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat

➤ **Diketahui :**

- Berat serbuk simplisia : 500 gram
- Berat ekstrak kental : 58,63 gram

Rendemen ekstrak :

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen ekstrak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak Kental}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100 \% \\
 &= \frac{58,63 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \% \\
 &= 11,72 \%
 \end{aligned}$$

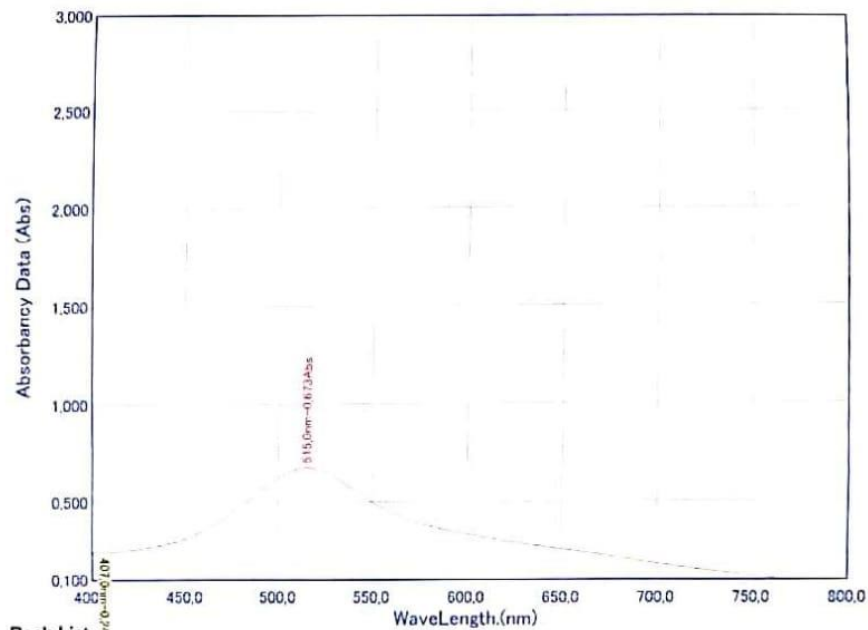
Lampiran 4. Skrining Fitokimia

Pengujian	Gambar	Hasil
Flavonoid		Terdapat warna kuning yang mencolok
Katekin		Terjadi perubahan warna jingga
Fenolik		Terjadi perubahan warna hitam
Tanin		Terjadi perubahan warna hijau kehitaman

Lampiran 5. Optimasi Panjang Gelombang

Wavelength Scan Test Report

File Name: PANJANG GEL.wis	Test Time: 20/06/2022 9:30:13
Software Version: UV V1.92.0	
Operator: Lab Kimia Farmasi	Company:
Scan Range: 400,0nm - 800,0nm	Scan Mode: Absorbance(Abs)



Peak List			
No.	Wavelength(nm)	Abs	Trans(%)
1	515,0	0,673	21,2
2	407,0	0,241	57,5
Max Record 400,0 nm - 800,0 nm			
No.	Wavelength(nm)	Abs	Trans(%)
1	515,0	0,673	21,2
MinRecord 400,0 nm - 800,0 nm			
No.	Wavelength(nm)	Abs	Trans(%)
1	800,0	0,083	82,7
Average Record 400,0 nm - 800,0 nm			
No.	Wavelength(nm)	Abs	Trans(%)
1	400,0-800,0	0,311	52,2
Record List			
No.	Wavelength(nm)	Abs	Trans(%)
1	800,0	0,083	82,7
2	799,0	0,083	82,6
3	798,0	0,083	82,6

Lampiran 6. Optimasi Waktu Inkubasi Kuersetin

Kuersetin						
INKUBASI	KONSENTRASI	LOG KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI	PROBIT	IC50
BLANGKO			0,638			
10 MENIT	0,63	-0,20	0,385	39,66	4,75	8,07
	2,5	0,40	0,351	44,98	4,85	
	5,63	0,75	0,336	47,34	4,92	
	10	1,00	0,311	51,25	5,03	
	15,63	1,19	0,291	54,39	5,1	
20 MENIT	0,63	-0,20	0,346	42,16	4,8	5,916
	2,5	0,40	0,334	47,49	4,95	
	5,63	0,75	0,324	49,69	5	
	10	1,00	0,313	51,41	5,03	
	15,63	1,19	0,300	53,14	5,08	
30 MENIT	0,63	-0,20	0,351	44,98	4,87	5,861
	2,5	0,40	0,334	47,65	4,95	
	5,63	0,75	0,326	48,9	4,97	
	10	1,00	0,312	51,1	5,03	
	15,63	1,19	0,299	53,14	5,08	
40 MENIT	0,63	-0,20	0,369	45,77	4,9	5,470
	2,5	0,40	0,335	47,65	4,95	
	5,63	0,75	0,321	49,22	4,97	
	10	1,00	0,310	51,1	5,03	
	15,63	1,19	0,299	52,98	5,08	
50 MENIT	0,63	-0,20	0,338	47,02	4,92	6,081
	2,5	0,40	0,331	48,12	4,95	
	5,63	0,75	0,321	49,69	5	
	10	1,00	0,313	50,94	5,03	
	15,63	1,19	0,311	51,25	5,03	
60 MENIT	0,63	-0,20	0,343	46,24	4,9	14,061
	2,5	0,40	0,341	46,55	4,92	
	5,63	0,75	0,324	49,22	4,97	
	10	1,00	0,321	49,69	5	
	15,63	1,19	0,319	50,00	5	

Menit	R ²
10	0,951
20	0,9816
30	0,9521
40	0,9039
50	0,9518
60	0,9267

Lampiran 7. Optimasi Waktu Inkubasi Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat

Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat						
INKUBASI	KONSENTRASI	LOG KONSENTRASI	ABS	% INHIBISI	PROBIT	IC50
BLANGKO			0,647			
10 MENIT	3,12	0,49	0,335	48,22	4,95	17,69
	12,5	1,10	0,332	48,69	4,97	
	28,12	1,45	0,32	50,54	5,03	
	50	1,70	0,317	51,00	5,03	
	78,12	1,89	0,312	51,78	5,05	
20 MENIT	3,12	0,49	0,333	48,53	4,97	18,12
	12,5	1,10	0,328	49,30	4,97	
	28,12	1,45	0,322	50,23	5,00	
	50	1,70	0,314	51,47	5,03	
	78,12	1,89	0,312	51,78	5,05	
30 MENIT	3,12	0,49	0,332	48,69	4,97	10,95
	12,5	1,10	0,324	49,92	5,00	
	28,12	1,45	0,319	50,70	5,03	
	50	1,70	0,315	51,31	5,03	
	78,12	1,89	0,31	52,09	5,05	
40 MENIT	3,12	0,49	0,332	48,69	4,97	10,95
	12,5	1,10	0,322	50,23	5,00	
	28,12	1,45	0,317	51,00	5,03	
	50	1,70	0,314	51,47	5,03	
	78,12	1,89	0,308	52,40	5,05	
50 MENIT	3,12	0,49	0,329	49,15	4,97	10,07
	12,5	1,10	0,323	50,08	5,00	
	28,12	1,45	0,315	51,31	5,03	
	50	1,70	0,312	51,78	5,05	
	78,12	1,89	0,308	52,40	5,05	
60 MENIT	3,12	0,49	0,327	49,46	4,97	7,04
	12,5	1,10	0,32	50,54	5,03	
	28,12	1,45	0,318	50,85	5,03	
	50	1,70	0,304	53,01	5,08	
	78,12	1,89	0,304	53,01	5,08	

Menit	R ²
10	0,9161
20	0,815
30	0,9711
40	0,9711
50	0,976
60	0,9293

Lampiran 8. Perhitungan Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH

Diketahui :

- Serbuk DPPH = 1,25 mg
- Volume pelarut = 25 mL

Konsentrasi larutan DPPH

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi (ppm)} &= \frac{mg}{mL} \times 1000 \\ &= \frac{1,25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 50 \text{ ppm}\end{aligned}$$

2. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat

a. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat

- Ekstrak kental = 12,5 mg
- Volume pelarut = 25 mL
- Konsentrasi Larutan Induk $= \frac{mg}{mL} \times 1000$
 $= \frac{12,5 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000$
 $= 500 \text{ ppm}$

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

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

➤ 50 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 1000 ppm

$$= \frac{50 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$= 0,25 \text{ mL}$$

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

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

- Konsentrasi dalam kuvet

$$\frac{2,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 3,12 \text{ ppm}$$

➤ 100 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 1000 ppm

$$= \frac{100 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

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

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

$$= 10 \text{ ppm}$$

- Konsentrasi dalam kuvet

$$\frac{10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 12,5 \text{ ppm}$$

➤ 150 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 1000 ppm

$$= \frac{150 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$= 0,75 \text{ mL}$$

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

$$= 22,5 \text{ ppm}$$

- Konsentrasi dalam kuvet

$$\frac{22,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 28,12 \text{ ppm}$$

➤ 200 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 1000 ppm

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

$$= 1 \text{ mL}$$

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

$$= 40 \text{ ppm}$$

- Konsentrasi dalam kuvet

$$\frac{22,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 50 \text{ ppm}$$

➤ 250 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 1000 ppm

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

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

- $= \frac{1,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ ppm}$

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

- Konsentrasi dalam kuvet

$$\frac{62,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 78,12 \text{ ppm}$$

3. Pembuatan Larutan Pembanding Kuersetin

a. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Diketahui :

- Serbuk Kuersetin = 2 mg
- Volume pelarut = 10 mL
- Konsentrasi larutan induk = $\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 1000$
 $= \frac{2 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000$
 $= 200 \text{ ppm}$

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

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

- 10 ppm
 - Pengambilan dari larutan induk ekstrak 200 ppm
 $= \frac{10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$
 $= 0,25 \text{ mL}$
 - $= \frac{0,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 10 \text{ ppm}$
 $= 0,5 \text{ ppm}$
 - Konsentrasi dalam kuvet
 $\frac{0,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 0,62 \text{ ppm}$

➤ 20 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 200 ppm

$$= \frac{20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$$

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

- $= \frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 20 \text{ ppm}$

$$= 2 \text{ ppm}$$

- Konsentrasi dalam kuvet

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

➤ 30 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 200 ppm

$$= \frac{30 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$$

$$= 0,75 \text{ mL}$$

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

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

- Konsentrasi dalam kuvet

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

➤ 40 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 200 ppm

$$= \frac{40 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$$

$$= 1 \text{ mL}$$

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

$$= 8 \text{ ppm}$$

- Konsentrasi dalam kuvet

$$\frac{8 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 10 \text{ ppm}$$

➤ 50 ppm

- Pengambilan dari larutan induk ekstrak 200 ppm

$$= \frac{50 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}}$$

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

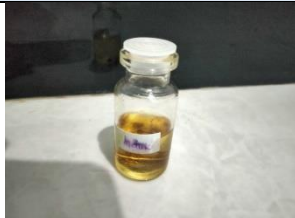
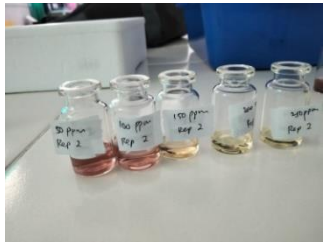
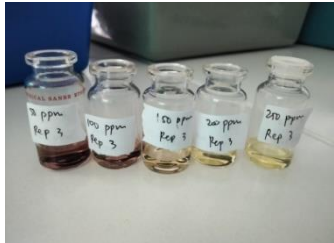
- $= \frac{1,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 50 \text{ ppm}$

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

- Konsentrasi dalam kuvet

$$\frac{12,5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 15,62 \text{ ppm}$$

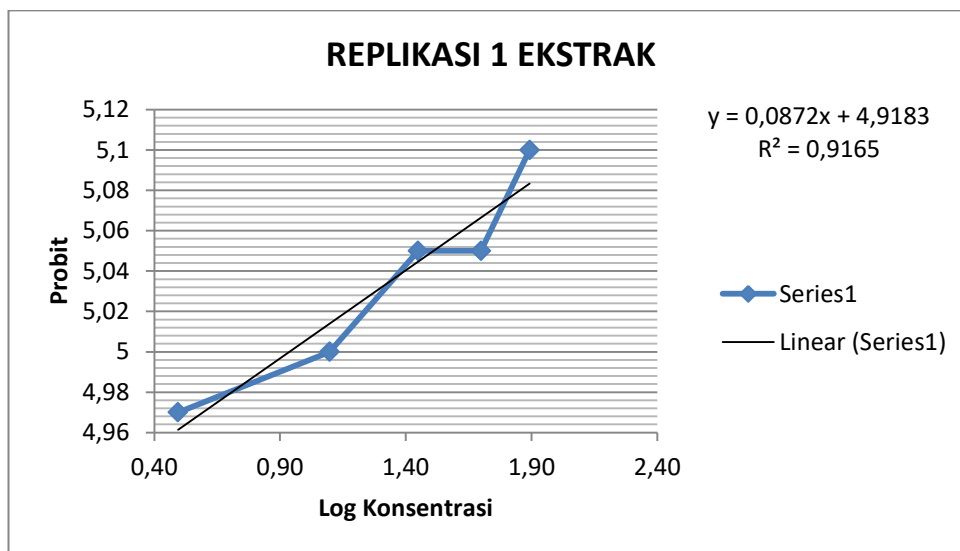
Lampiran 9. Dokumentasi Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat	
	
Pembuatan Larutan Induk Kuersetin	
	
Pengukuran Aktivitas Antioksidan Keping Biji Coklat	Pengukuran Aktivitas Antioksidan Kuersetin
Replikasi 1 	Replikasi 1 
Replikasi 2 	Replikasi 2 
Replikasi 3 	Replikasi 3 

Lampiran 10. Persamaan Regresi linier dan Nilai IC₅₀ Ekstrak Metanol

Keping Biji Coklat

Replikasi 1



Probit 5 = 50% Peredaman

Persamaan Linier

$$y = bx + a$$

$$5 = 0,0872x + 4,9183$$

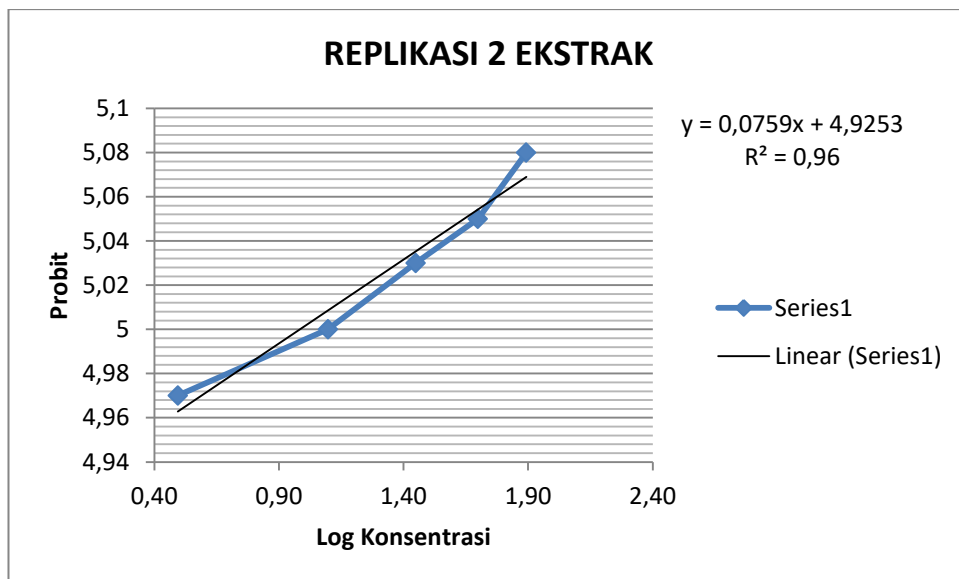
$$x = 0,937$$

$$IC_{50} = \text{Antilog } x$$

$$= \text{Antilog } 0,937$$

$$= 8,648 \mu\text{g/mL (Sangat Kuat)}$$

Replikasi 2



Probit 5 = 50% Peredaman

Persamaan Linier

$$y = bx + a$$

$$5 = 0,0759x + 4,9253$$

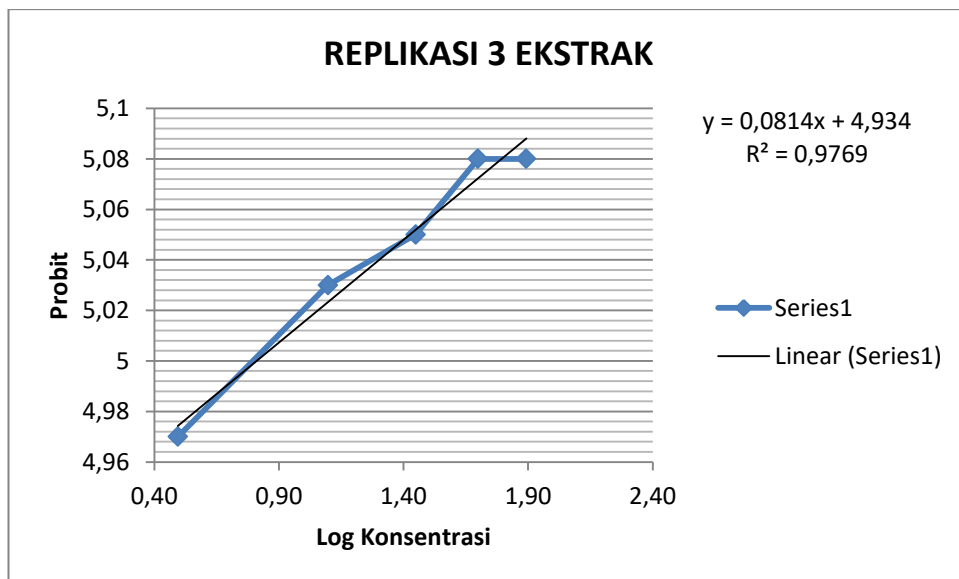
$$x = 0,9841$$

$$IC_{50} = \text{Antilog } x$$

$$= \text{Antilog } 0,9841$$

$$= 9,643 \mu\text{g/mL (Sangat Kuat)}$$

Replikasi 3



Probit 5 = 50% Peredaman

Persamaan Linier

$$y = bx + a$$

$$5 = 0,0814x + 4,934$$

$$x = 0,8108$$

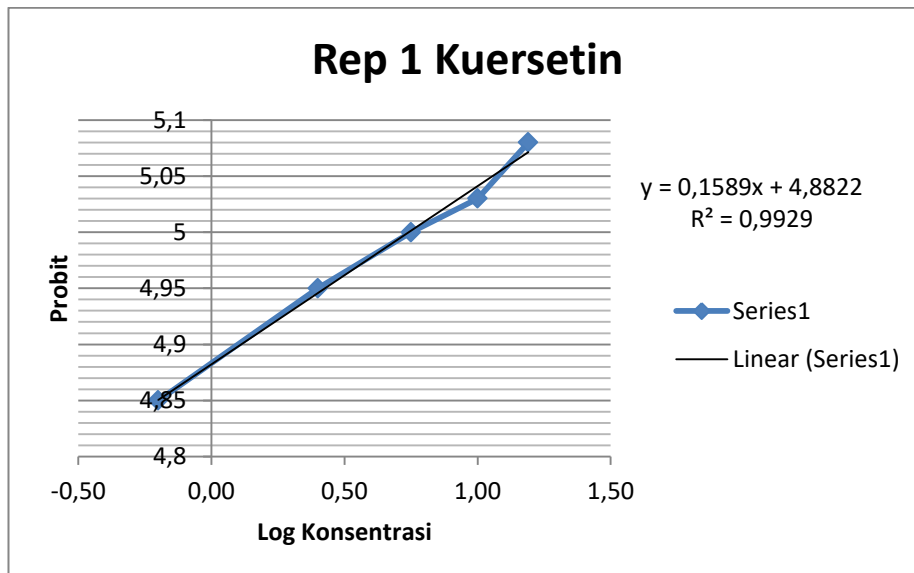
$$\text{IC50} = \text{Antilog } x$$

$$= \text{Antilog } 0,8108$$

$$= 6,469 \mu\text{g/mL (Sangat Kuat)}$$

Lampiran 11. Persamaan Regresi Linier dan Nilai IC50 Kuersetin

Replikasi 1



Probit 5 = 50% Peredaman

Persamaan Linier

$$y = bx + a$$

$$5 = 0,159x + 4,882$$

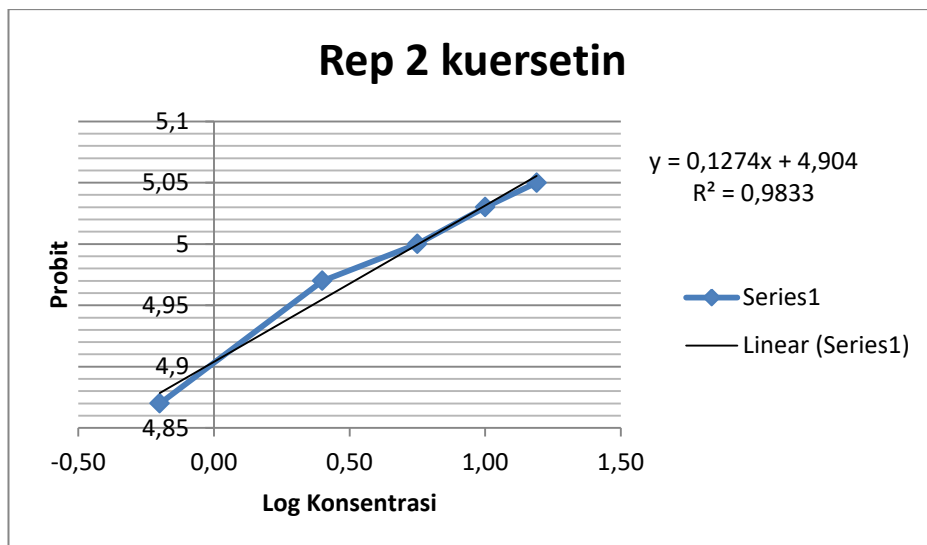
$$x = 0,742$$

$$\text{IC50} = \text{Antilog } x$$

$$= \text{Antilog } 0,742$$

$$= 5,521 \mu\text{g/mL (Sangat Kuat)}$$

Replikasi 2



Probit 5 = 50% Peredaman

Persamaan Linier

$$y = bx + a$$

$$5 = 0,1274x + 4,904$$

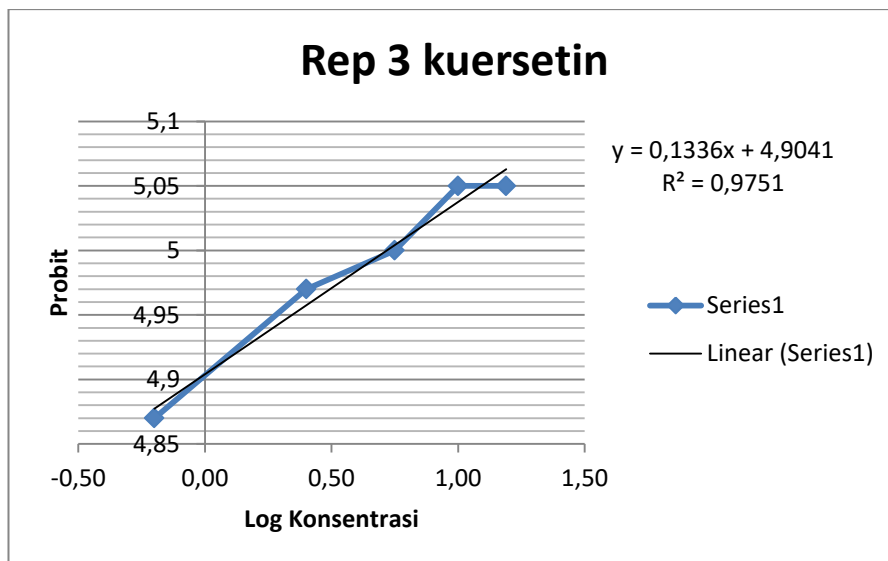
$$x = 0,756$$

$$IC_{50} = \text{Antilog } x$$

$$= \text{Antilog } 0,756$$

$$= 5,702 \mu\text{g/mL (Sangat Kuat)}$$

Replikasi 3



Probit 5 = 50% Peredaman

Persamaan Linier

$$y = bx + a$$

$$5 = 0,1336x + 4,9041$$

$$x = 1,46105$$

$$IC_{50} = \text{Antilog } x$$

$$= \text{Antilog } 1,46105$$

$$= 5,222 \mu\text{g/mL (Sangat Kuat)}$$

Lampiran 12. *Photometry Test Report* Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat dan Kuersetin

1. Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat

Photometry Test Report

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

Test Record List.

No.	WL(nm)	Abs	Trans(%T)	Test Time	Sample Name
1	515.0	0.651	22.1	29/06/2022 12:30:15	Blanko
2	515.0	0.332	46.5	29/06/2022 12:35:11	50 PPM 50 MENIT R1
3	515.0	0.334	46.4	29/06/2022 12:35:30	50 PPM 50 MENIT R2
4	515.0	0.335	46.2	29/06/2022 12:35:49	50 PPM 50 MENIT R3
5	515.0	0.325	47.4	29/06/2022 12:44:52	100 PPM 50 MENIT R1
6	515.0	0.323	47.6	29/06/2022 12:45:11	100 PPM 50 MENIT R2
7	515.0	0.334	46.4	29/06/2022 12:45:32	100 PPM 50 MENIT R3
8	515.0	0.320	47.9	29/06/2022 12:45:54	100 PPM 50 MENIT R3
9	515.0	0.339	45.8	29/06/2022 12:54:37	150 PPM 50 MENIT R1
10	515.0	0.314	48.6	29/06/2022 12:54:57	150 PPM 50 MENIT R1
11	515.0	0.280	52.4	29/06/2022 12:55:19	150 PPM 50 MENIT R2
12	515.0	0.317	48.2	29/06/2022 12:55:55	150 PPM 50 MENIT R2
13	515.0	0.315	48.3	29/06/2022 12:55:13	150 PPM 50 MENIT R3
14	515.0	0.310	48.9	29/06/2022 13:04:35	200 PPM 50 MENIT R1
15	515.0	0.312	48.8	29/06/2022 13:04:55	200 PPM 50 MENIT R2
16	515.0	0.308	49.2	29/06/2022 13:05:13	200 PPM 50 MENIT R3
17	515.0	0.324	47.4	29/06/2022 13:14:46	250 PPM 50 MENIT R1
18	515.0	0.302	49.9	29/06/2022 13:15:08	250 PPM 50 MENIT R1
19	515.0	0.304	49.7	29/06/2022 13:15:39	250 PPM 50 MENIT R2
20	515.0	0.312	48.8	29/06/2022 13:15:57	250 PPM 50 MENIT R3
21	515.0	0.303	49.8	29/06/2022 13:16:19	250 PPM 50 MENIT R3

2. Kuersetin

Photometry Test Report

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

Test Record List.

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

Lampiran 13. Tabel Probit

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

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