

**ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL
EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
MENGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI**

SKRIPSI



**Oleh:
Roudatul Jannah
NIM. 19040119**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023**

**ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL
EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
MENGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh:
Roudatul Jannah
NIM. 19040119

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023**

HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti seminar hasil Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas dr. Soebandi

Jember, 01 Agustus 2023

Pembimbing Utama



apt. Lindawati Setyaningrum., M.Farm
NIDN. 0703068903

Pembimbing Anggota



Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN. 0709129002

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Analisis dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menggunakan KLT-Densitometri” telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Hari : Senin

Tanggal : 14 Agustus 2023

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas dr. Soebandi

Ketua Penguji

Susilawati, S.ST., M.Kes
NIDN. 4003127401

Penguji II

apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 0703068903

Penguji III

Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN. 0709129002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas dr. Soebandi

apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 0703068903

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Roudatul Jannah

NIM : 19040119

Program Studi : Sarjana Farmasi

Fakultas / Asal Instansi : Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr Soebandi

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, 01 Agustus 2023

Yang menyatakan,



(Roudatul Jannah)

SKRIPSI

ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) MENGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI

Oleh:

**Roudatul Jannah
NIM. 19040119**

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Aliyah Purwanti, M.Si

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim....

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

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

- 1) Skripsi ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya, Alm. Abah Jasuli dan Umi Erhama yang sudah berjasa dalam dalam hidup saya. Terima kasih atas do'a serta dukungan yang tak pernah henti dan selalu memberikan motivasi saya dalam mewujudkan cita-cita saya.
- 2) Terima kasih kepada semua Dosen dan keluarga Universitas dr. Soebandi yang telah memberikan ilmu pengetahuan, dan memberikan banyak motivasi selama saya duduk di bangku perkuliahan. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan ibu dan bapak dosen.
- 3) Terima kasih kepada Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku dosen pembimbing utama, Ibu Aliyah Purwanti, M.Si selaku dosen pembimbing anggota, dan Ibu Susilawati, S.ST., M. Kes selaku ketua penguji saya yang telah bersedia meluangkan waktunya dalam memberikan bimbingan dan arahan dalam proses penyusunan skripsi ini.

- 4) Terima kasih kepada kakak saya Danil Rohman, adik saya Dafin Akbar Maulana, dan kakak ipar saya Putri Erika Wati serta keponakan saya Cindy Shidqia Rahman dan Maudy Anandara Rahman yang telah memberikan do'a dan dukungannya selama penulisan skripsi ini.
- 5) Terima kasih kepada sahabat-sahabat saya Ramadhanies Prizqylla Firdaus, Putri Kusuma Wardhani, Novi Ahdina, Savania Alifianty Hafzah, Putri Puji Lestari, dan Fitri Ayu Endahsari yang telah memberikan dukungan selama penulisan skripsi ini.
- 6) Kepada Nadha dan Lilik teman seperjuangan di lab, terima kasih telah membantu dan mendukung selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
- 7) Teman-teman seperjuangan 19C Farmasi dan seluruh pihak yang telah membantu dan memberikan masukan yang sangat berarti bagi penyusun.

MOTTO

*“To achieve what you want, you have to pursue and fight to make it happen. Then
at the same time take care of yourself and your health”*

“Untuk menggapai apa yang kamu inginkan, kamu harus mengejar dan berjuang
untuk mewujudkannya. Kemudian pada saat yang bersamaan jaga dirimu dan
kesehatanmu”

~ Park Chanyeol ~

*“There will be times when something gets tiring, but don't give up. Just endure a
little more and it will be over soon”*

“Akan ada saatnya sesuatu itu akan melelahkan, tetapi jangan menyerah.
Bertahanlah sedikit lagi dan itu akan segera berakhir”

~ Zhang Yixing ~

ABSTRAK

Jannah, Roudatul *, Setyaningrum, Lindawati **, Purwanti, Aliyah ***. 2023. **Analisis dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menggunakan KLT-Densitometri.** Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Biji kakao memiliki banyak manfaat, diantaranya sebagai antidepresan dan antibakteri. Biji kakao memiliki senyawa kimia salah satunya yaitu alkaloid. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Desain penelitian ini adalah deskriptif laboratorium. Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi fase gerak, optimasi panjang gelombang, optimasi konsentrasi dan penetapan kadar alkaloid total dengan metode KLT-Densitometri pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah kloroform : etanol (99:1) v/v karena noda pada plat KLT sejajar. Konsentrasi standar yang digunakan yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dan konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 2000 ppm karena luas area sampel masuk dalam rentang luas area standar. Panjang gelombang optimum adalah 275 nm karena panjang gelombang ini menghasilkan sensitivitas pengukuran yang baik. Kadar alkaloid total yang diperoleh yaitu 2,003 % b/b. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu terdapat kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri sebesar 2,003 % b/b per 50 mg sampel dan kadar alkaloid total ini sesuai dengan rentang kadar alkaloid total pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) 0,8-3,7 % b/b. Metode dan optimasi pada penelitian ini dapat digunakan untuk menganalisis kadar alkaloid total pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang dibuktikan dengan hasil kadar yang dihasilkan masuk dalam rentang kadar alkaloid total pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

Kata Kunci: Biji Kakao, Alkaloid, KLT-Densitometri

*Peneliti

**Pembimbing Utama

***Pembimbing Anggota

ABSTRACT

Jannah, Roudatul *, Setyaningrum, Lindawati **, Purwanti, Aliyah ***. 2023. **Analysis and Determination of Total Alkaloid Content of Ethanol Extract of Cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) Using TLC-Densitometry.** Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program, University of dr. Soebandi.

Cocoa beans have many benefits, including as an antidepressant and antibacterial. Cocoa beans have chemical compounds, one of which is alkaloids. The purpose of this study was to determine the total alkaloid content in the ethanol extract of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). The research design is a descriptive laboratory. In this research, mobile phase optimization, wavelength optimization, concentration optimization and determination of total alkaloid content will be carried out using the TLC-Densitometry method on the ethanol extract of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). The mobile phase used in this study was chloroform : ethanol (99:1) v/v because the stains on the TLC plate were parallel. The standard concentrations used were 200, 400, 600, 800 and 1000 ppm and the sample concentration used was 2000 ppm because the sample area falls within the standard area range. The optimum wavelength is 275 nm as this gives good measurement sensitivity. The total alkaloid content obtained was 2.003% w/w. The conclusion of this study is that there is a total alkaloid content in the ethanol extract of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) using TLC-Densitometry of 2.003% w/w per 50 mg sample and this total alkaloid content corresponds to the range of total alkaloid content in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) 0.8-3.7 % w/w. The methods and optimization in this study can be used to analyze the total alkaloid content in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) as evidenced by the results of levels that fall within the range of total alkaloid levels in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.).

Keywords: Cocoa Beans, Alkaloids, TLC-Densitometry

*Author

**Main Advisor

***Member Advisor

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun dengan judul “Analisis dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menggunakan KLT-Densitometri”.

Selama proses penyusunan skripsi ini penulis dibantu dan dibimbing oleh berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- 1) Andi Eka Pratama, S.ST., S.Kep., Ns. M.Kes. selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
- 2) apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
- 3) apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
- 4) apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku pembimbing utama
- 5) Aliyah Purwanti, M.Si. selaku pembimbing anggota
- 6) Susilawati, S.ST., M.Kes. selaku ketua penguji

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan di masa mendatang.

Jember, 01 Agustus 2023

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Judul	ii
Halaman Persetujuan Pembimbing.....	iii
Halaman Pengesahan.....	iv
Halaman Pernyataan Orisinalitas	v
Halaman Pembimbing Skripsi	vi
Halaman Persembahan.....	vii
Motto	ix
Abstrak.....	x
<i>Abstract</i>	xi
Kata Pengantar.....	xii
Daftar Isi	xiii
Daftar Tabel.....	xvi
Daftar Gambar	xvii
Daftar Lampiran	xviii
Daftar Singkatan	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Secara Teoritis	7
1.4.2 Secara Praktik	7
1.5 Keaslian Penelitian	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	10
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	10
2.1.2 Morfologi Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	10
2.1.3 Kandungan Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	15
2.1.4 Manfaat Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	16
2.2 Ekstraksi	19
2.2.1 Definisi Ekstraksi	19
2.2.2 Metode Ekstraksi	19
2.3 Pelarut.....	26
2.3.1 Kloroform	26
2.3.2 Asam Asetat.....	27
2.3.3 Metanol.....	27
2.3.4 Aseton.....	27
2.3.5 Etanol.....	27
2.4 Senyawa Alkaloid.....	28

2.4.1	Pengertian Alkaloid	28
2.4.2	Sifat Umum Alkaloid.....	29
2.4.3	Klasifikasi Alkaloid.....	30
2.5	Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	32
2.5.1	Pengertian Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	32
2.5.2	Kelebihan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	33
2.5.3	Fase Diam	34
2.5.4	Fase Gerak	35
2.5.5	Penetapan Harga Rf	37
2.6	Densitometri	38
BAB 3	KERANGKA KONSEP.....	41
3.1	Kerangka Konsep	41
3.2	Hipotesis Penelitian	42
BAB 4	METODE PENELITIAN	43
4.1	Desain Penelitian	43
4.2	Populasi dan Sampel.....	43
4.2.1	Populasi	43
4.2.2	Sampel	43
4.3	Variabel Penelitian.....	44
4.3.1	Variabel Bebas (<i>Independent</i>)	44
4.3.2	Variabel Terikat (<i>Dependent</i>).....	44
4.4	Tempat Penelitian	44
4.5	Waktu Penelitian.....	44
4.6	Definisi Operasional	44
4.7	Teknik Pengumpulan Data	47
4.7.1	Pengambilan Sampel	47
4.7.2	Determinasi Tanaman.....	47
4.7.3	Ekstraksi Maserasi.....	47
4.7.5	Optimasi Kondisi Analisis KLT-Densitometri.....	48
4.7.6	Penetapan Kadar Alkaloid Total menggunakan KLT-Densitometri.....	50
BAB 5	HASIL PENELITIAN	53
5.1	Data Umum.....	53
5.1.1	Determinasi Tanaman Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	53
5.1.2	Ekstraksi Maserasi	53
5.1.3	Fraksinasi.....	53
5.2	Data Khusus.....	54
5.2.1	Optimasi Kondisi Analisis Kadar Alkaloid Total.....	54
5.2.2	Penetapan Kadar Alkaloid Total.....	56
BAB 6	PEMBAHASAN	58
6.1	Determinasi dan Ekstraksi Sampel Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	58
6.1.1	Determinasi Tanaman Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	58
6.1.2	Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi.....	58
6.2	Optimasi Kondisi Analisis Alkaloid Total	62
6.2.1	Optimasi Penentuan Fase Gerak.....	63
6.2.2	Optimasi Penentuan Konsentrasi Larutan Standar dan	

Larutan Sampel	64
6.2.3 Optimasi Panjang Gelombang Optimum.....	65
6.3 Penetapan Kadar Alkaloid Total.....	66
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	70
7.1 Kesimpulan.....	70
7.2 Saran	70
DAFTAR PUSTAKA	72
LAMPIRAN.....	80

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	8
Tabel 2.1 Komponen Kandungan Kimia Biji Kakao.....	15
Tabel 2.2 Konstanta Dielektrum Pelarut Organik.....	26
Tabel 2.3 Klasifikasi Alkaloid	31
Tabel 2.4 Urutan Pelarut Berdasarkan Kekuatan Elusi.....	37
Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel.....	45
Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	53
Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Rendemen Fraksinasi	53
Tabel 5.3 Optimasi Fase Gerak.....	54
Tabel 5.4 Data Nilai Luas Area dan Nilai R_f	56
Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Kadar Alkaloid Total.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	10
Gambar 2.2 Buah Kakao	13
Gambar 2.3 Anatomi Buah Kakao	14
Gambar 2.4 Struktur Senyawa <i>True Alkaloid</i>	30
Gambar 2.5 Struktur Senyawa <i>Protoalkaloid</i>	30
Gambar 2.6 Struktur Senyawa <i>Pseudoalkaloid</i>	31
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	41
Gambar 5.1 Fase gerak klorofom:etanol (95:5) v/v	55
Gambar 5.2 Panjang Gelombang Optimum (275 nm)	56
Gambar 5.3 Kurva Baku Kafein.....	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman	80
Lampiran 2. Sertifikat Kafein	81
Lampiran 3. Persiapan Sampel dan Proses Ekstraksi.....	82
Lampiran 4. Perhitungan Ekstraksi Maserasi.....	83
Lampiran 5. Perhitungan Fraksinasi	83
Lampiran 6. Penelitian Menggunakan Instrumen KLT-Densitometri	83
Lampiran 7. Nilai Luas Area, Nilai R_f , dan Nilai Korelasi.....	85
Lampiran 8. Perhitungan Konsentrasi Larutan Stok, Pengenceran Larutan Stok, Larutan Sampel, dan Persamaan Regresi Linier	86
Lampiran 9. Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	88
Lampiran 10. Kurva Baku Kafein.....	92
Lampiran 11. Panjang Gelombang Optimum Kafein 275 nm	92

DAFTAR SINGKATAN

cm	= Sentimeter
FP	= Faktor Pengenceran
HPLC	= <i>high performance liquid chromatography</i>
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
LDL	= <i>Low-density Lipoprotein</i>
m	= Meter
MDA	= <i>Molandaldehyd</i>
Mdpl	= Meter di atas permukaan laut
mL	= Mililiter
mm	= Millimeter
N	= Normalitas
nm	= Nanometer
PMT	= <i>Photomultipliers</i>
ppm	= <i>Part Per Million</i>
Puslitkoka	= Pusat Penelitian kopi dan Kakao
REM	= Radiasi Elektromagnetik

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia terkenal dengan keanekaragaman hayati terbesar di dunia. Indonesia memiliki spesies tanaman sebanyak 25.000. Berdasarkan Kementerian Kelautan dan Perikanan (2015) menyatakan spesies tanaman di Indonesia dengan jumlah 25.000 spesies tanaman menempatkan Indonesia berada di posisi kedua setelah Brazil. Dari 25.000 spesies tanaman di Indonesia, terdapat 9.609 spesies di Indonesia yang memiliki khasiat sebagai obat. Sekitar 74% tumbuh liar di hutan dan sisanya sekitar 26% telah dibudidayakan. Dari 26% yang telah dibudidayakan, lebih dari 940 spesies tanaman telah digunakan sebagai obat tradisional (Yassir dan Asnah, 2019).

Salah satu tanaman yang dibudidayakan adalah tanaman kakao. Tanaman kakao dibudidayakan dan dikembangkan salah satunya di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (Puslitkoka) ini berdiri sejak 1 Januari 1911. Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 786/Kpts/Org/9/1981 tanggal 20 Oktober 1981. Puslitkoka memiliki tugas untuk melakukan penelitian dan pengembangan komoditas kopi dan kakao berskala nasional (Susilo *et al*, 2019). Puslitkoka memiliki mitra dalam mengembangkan kopi dan kakao, diantaranya 6 Kementrian, 30 Perguruan Tinggi, dan 100 kabupaten yang tersebar di seluruh Indonesia. Salah satu kabupaten yang menjadi mitra Puslitkoka adalah Kabupaten Jember. Puslitkoka di Kabupaten Jember terletak di Jalan Perkebunan Renteng, Kecamatan Jenggawah dan kantor Puslitkoka

berada di Jalan Pb. Sudirman no. 90 (Felicia *et al*, 2016). Populasi penelitian memilih di puslitkoka yang berada di Jalan Perkebunan Renteng karena berada pada ketinggian 45 mdpl. Ketinggian lahan ini sesuai dengan pengelompokan berdasarkan kelas kesesuaian lahan pada suatu wilayah, yaitu termasuk kelompok S1 atau sangat sesuai dengan rentang ketinggian 0-600 mdpl (Farhanandi & Indah, 2022).

Kakao memiliki nama ilmiah *Theobroma cacao* L. Tanaman kakao ini terdiri atas akar, batang, daun, bunga, dan buah. Ada 3 komponen besar dari buah kakao yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Kualitas biji kakao di Indonesia masih tergolong rendah karena praktik penanganan setelah panen yang kurang baik. Penanganan setelah panen biji kakao secara umum terdiri dari pemeraman, fermentasi, pengeringan, sortasi, pengemasan dan penggudangan. Biji kakao yang berkualitas tinggi memiliki persyaratan yang memenuhi standar SNI 2323-2008/Amandemen 1:2010 (Hartuti *et al*, 2020). Selain itu, pada saat panen petani biasanya akan mengambil biji kakao dan menjualnya sebagai produk mentahan. Padahal biji kakao memiliki banyak manfaat, diantaranya sebagai antidepresan, menurunkan kolesterol darah, antikanker, dan sebagai antibakteri (Smith, 2013; Zulkifli *et al*, 2016; Baharum *et al*, 2016; Tunjung-sari *et al*, 2016). Biji kakao dapat menghambat beberapa jenis bakteri seperti *S. pyogenes*, *S.dysenteriae*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Pohan *et al*, 2020; Tunjung-sari *et al*, 2016; Kumalasari dan Suswati, 2015).

Biji kakao juga memiliki kandungan senyawa kimia. Kandungan dari biji kakao yaitu flavonoid sebagaimana kandungan ini memiliki efek antidepresan

(Smith, 2013). Selain itu, terdapat katekin dan epikatekin yang memiliki peran sebagai antioksidan yang dapat menurunkan kolesterol darah (Zulkifli *et al*, 2016). Terdapat juga senyawa prosianidin yang memiliki peran sebagai antikanker (Baharum *et al*, 2016). Sebagai antibakteri banyak senyawa yang berperan didalamnya seperti polifenol yang memiliki aktivitas antibakteri pada ekstrak biji kakao karena adanya *methylxanthines* (Anshari, 2017). Terdapat kandungan flavonoid dari senyawa polifenol juga bisa menyebabkan aktivitas antibakteri (Kumalasari dan Suswati, 2015). Selain polifenol juga terdapat alkaloid yang memiliki aktivitas antibakteri (Pohan *et al*, 2020).

Alkaloid termasuk salah satu metabolit sekunder yang dapat digunakan untuk pengobatan penyakit. Atropin, morfin, kina, dan vinkristin termasuk golongan alkaloid yang dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, yaitu malaria hingga kanker (Nora & Seprianto, 2017). Selain itu juga terdapat kafein yang juga termasuk golongan alkaloid yang memiliki aktivitas antibakteri dengan cara merangsang sel bakteri untuk mengalami perubahan morfologi dan lisis (Tunjung-sari *et al*, 2016). Oleh karena itu dalam penelitian ini berfokus pada penelitian penetapan kadar alkaloid total sebagai senyawa yang terkandung di dalam biji kakao yang memiliki potensi sebagai pengobatan.

Senyawa alkaloid dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan campuran antara pelarut dengan zat terlarut. Banyak jenis metode ekstraksi yang bisa digunakan seperti maserasi (Maulana, 2018), sokletasi (Wathan *et al*, 2020), perkolasi (Rahmi *et al*, 2021), dan refluks (Rusdi dan Hasan, 2018) hingga ekstraksi modern seperti *ultrasonic* (Sganzerla *et al*, 2014) dan *microwave*

(Zahar *et al*, 2021). Jika dibandingkan dengan metode yang ada, metode maserasi memiliki kelebihan antara lain alat yang dipakai sangat sederhana yaitu hanya membutuhkan wadah perendaman tetapi menghasilkan produk yang baik. Selain itu, menggunakan ekstraksi maserasi zat yang tidak tahan panas tidak akan rusak (D. R. Ningsih *et al*, 2016). Setelah diperoleh ekstrak kental dari ekstraksi maserasi akan dilanjutkan dengan ekstraksi fraksinasi.

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa utama yang akan diteliti. Dari ekstraksi fraksinasi ini diharapkan bisa menghilangkan zat pengotor yang ada di dalam ekstrak (Amalia & Arsito, 2017). Proses ekstraksi dapat berjalan dengan sempurna jika menggunakan pelarut yang sesuai.

Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah pelarut etanol 96%. Pelarut ini digunakan karena bersifat universal yang bisa digunakan untuk mengekstrak semua golongan senyawa metabolit sekunder (Kapondo *et al*, 2020). Selain itu, etanol 96% lebih mudah masuk berpenetrasi ke dalam dinding sel sampel daripada pelarut etanol dengan konsentrasi lebih rendah, sehingga menghasilkan ekstrak yang pekat karena etanol 96% memiliki komposisi campuran etanol yang lebih banyak daripada air dengan perbandingan 24:1 (Wendersteyt *et al*, 2021; Wahyuni dan Marpaung, 2020). Hal ini juga didukung oleh penelitian yang membandingkan berbagai konsentrasi, yaitu konsentrasi pelarut etanol yaitu 50%, 70%, dan 96%. Dari hasil penelitian didapatkan kadar alkaloid total tertinggi berada pada konsentrasi 96% (Wahyuni dan Marpaung, 2020). Setelah dilakukan proses ekstraksi, maka akan dilakukan penetapan kadar pada alkaloid.

Penetapan kadar dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai macam metode diantaranya metode spektrofotometri *Ultraviolet-Visible* (UV-VIS) (Kristariyanto *et al*, 2022), metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Okzelia *et al*, 2017), metode gravimetri (Alasa *et al*, 2017), metode spektrodensitometri (Pamungkas dan Murrukmihadi, 2015), metode spektrofotometri visibel (Salamah *et al*, 2017), dan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri (KLT-Densitometri) (Savitri dan Megantara, 2019). Penetapan kadar pada penelitian ini menggunakan KLT-Densitometri karena berdasarkan farmakope KLT bisa digunakan untuk penetapan kadar salah satunya adalah kadar alkaloid (Rosamah, 2019). Selain itu, menggunakan metode KLT kadar yang ditetapkan dapat dilakukan secara langsung pada sampel suspensi atau sampel keruh, cepat, dan memungkinkan terjadi secara simultan dan metode KLT lebih mudah dan alat yang digunakan sederhana (Savitri dan Megantara, 2019). Metode KLT memiliki prinsip kerja kromatografi yaitu pemisahan campuran dari 2 fase yang terdiri dari fase gerak dan fase diam (Laily, 2016).

Berdasarkan uraian dari latar belakang diatas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian penetapan kadar alkaloid total menggunakan ekstrak etanol biji kakao. Metode yang digunakan untuk penetapan kadar alkaloid total yaitu menggunakan metode KLT-Densitometri.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Bagaimana kondisi optimum dari analisis penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri ?
- 2) Berapakah kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum dari analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode KLT-Densitometri.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Untuk mengetahui fase gerak terbaik pada kondisi optimum dari analisis penetapan kadar ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode KLT-Densitometri.
- 2) Untuk mengetahui panjang gelombang terbaik pada kondisi optimum dari analisis penetapan kadar ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode KLT-Densitometri.
- 3) Untuk mengetahui konsentrasi larutan terbaik pada kondisi optimum dari analisis penetapan kadar ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode KLT-Densitometri.
- 4) Untuk mengetahui kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Secara Teoritis

Pada penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi ilmu pengetahuan mengenai kondisi optimum dari analisis penetapan kadar alkaloid total dengan ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri.

1.4.2 Secara Praktik

1) Bagi Peneliti

Diharapkan menjadi sumber data atau referensi mengenai penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri.

2) Bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao

Diharapkan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dapat meneliti lebih lanjut mengenai penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri.

3) Bagi Institusi Pendidikan

Diharapkan menjadi pedoman untuk melakukan praktikum penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri.

4) Bagi Masyarakat

Diharapkan menambah wawasan untuk masyarakat umum mengenai penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Peneliti	Tahun Terbit	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Ade Ferdinan, Fitri Sri Rizki, Nunik Rahmawati	2021	Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Etanol Daun Pandan Hutan Jenis Baru (<i>Freycinetia sessiliflora Rizki</i>)	Sampel penelitian yang digunakan yaitu ekstrak etanol daun pandan hutan jenis baru (<i>Freycinetia sessiliflora Rizki</i>) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Penetapan kadar alkaloid menggunakan metode KLT-Densitometri dengan fase gerak untuk senyawa alkaloid yaitu eluen etil asetat : metanol : NH ₄ OH (85:10:5) dengan nilai R _f rata-rata 0,4.
Muksin Maulana	2018	Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Bidara Arab (<i>Ziziphus spina cristi. L</i>) Berdasarkan Variasi Pelarut	Sampel penelitian yang digunakan yaitu ekstrak daun bidara arab (<i>Ziziphus spina cristi. L</i>) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol kemudian difraksinasi. Penetapan kadar alkaloid menggunakan metode KLT-Densitometri dengan fase gerak terbaik untuk senyawa alkaloid yaitu eluen n-heksana : etil asetat : etanol (30:2:1) dengan nilai R _f 0,31.
Syarifatul Laily	2016	Analisis Kafein Pada Daun Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>) Dan Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri	Sampel penelitian yang digunakan yaitu ekstrak daun kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>) dan robusta (<i>Coffea canephora</i>) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut kloroform. Penetapan kadar kafein menggunakan metode KLT-Densitometri dengan fase gerak terbaik untuk senyawa kafein yaitu etil asetat : metanol (2:1) dengan nilai R _f rata-rata 0,6.
Dina Maya Syari, Rosidah Rosidah, Poppy Anjelisa Zaitun Hasibuan, Ginda Haro, Denny Satria	2019	Evaluation of Cytotoxic Activity Alkaloid Fractions of <i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC. Fruits	Sampel penelitian yang digunakan yaitu ekstrak buah andaliman (<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> F.) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol kemudian di fraksinasi. Penetapan kadar alkaloid menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase gerak untuk senyawa

Elisabeth Oriana 2020 Jawa La, Repining Tiyas Sawiji, Agustina NilaYuliawati	Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Kulit Buah Naga Merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	alkaloid yaitu eluen kloroform : metanol : amonia (18:15:1) nilai Rf rata-rata 0,5. Sampel penelitian yang digunakan yaitu ekstrak etanol kulit buah naga merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Penetapan kadar alkaloid menggunakan metode KLT- Densitometri dengan fase gerak untuk senyawa alkaloid yaitu eluen etil asetat : methanol : air (100 : 13,5 : 10) dengan nilai Rf rata-rata 0,7.
--	--	--

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)



Sumber: (Pratiwi S.P., 2022)

Gambar 2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Berikut klasifikasi dari tanama kakao (Martono, 2014):

Kelas : Dicotyledoneae

Subkelas : Dialypetalae

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Ordo : Malvales

Famili : Sterculiaceae

Genus : *Theobroma*

Spesies : *Theobroma cacao* L.

2.1.2 Morfologi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao tumbuh secara liar di Lembah Amazon dan daerah tropis lainnya di Amerika Tengah dan Selatan. Tanaman kakao juga tersebar di beberapa negara, di antaranya Belize, Kolombia, Costa Rika, Pantai Gading, Republik Demokrasi Kongo, Dominika, Ekuador, Gabon, Ghana, Guinea, India,

Indonesia, Jamaika, Madagaskar, Malaysia, Nigeria, Papua Nugini, Filipina, Samoa, Sao Tome et Principe, Sierra Leone, Srilanka, Suriname, Tanzania, Togo, Trinidad, dan Tobago, Uganda, serta Venezuela (Martono, 2014).

Tanaman kakao memiliki bentuk batang yang tumbuh tinggi dan tegak. Pada saat tanaman kakao berumur 3 tahun, tumbuhan ini memiliki tinggi dengan kisaran 1,8-3 m dan pada umur 12 tahun mencapai 4,5-7 m. Berbeda dengan tanaman kakao yang tumbuh liar yang ketinggiannya mencapai 20 m. Tanaman kakao memiliki dua bentuk cabang, yaitu cabang *orthotrop* (cabang yang tumbuh ke atas) dan cabang *plagiotrop* (cabang yang tumbuh ke samping). Diantara batang dan kedua jenis cabang tersebut tunas-tunas air atau *wiwilan* banyak tumbuh sehingga banyak menyerap energi dan akan mengurangi pembungaan dan pembuahan (Martono, 2014).

Daun kakao termasuk jenis daun tunggal (*folium simplex*), pada tangkai daun hanya terdapat satu helaian daun. Bentuk tangkai daun (*petiolus*) silinder dan bersisik halus (tergantung pada tipenya), pangkal membulat, ujung runcing dengan panjang $\pm 25-28$ mm dan diameter $\pm 3-7,4$ mm. Panjang daun kakao mencapai 10-48 cm dan lebar 4-20 cm. Pada bagian permukaan atas daun tua berwarna hijau dan bergelombang, sedangkan permukaan bawah daun tua berwarna hijau muda, kasar, dan bergelombang. Tanaman kakao memiliki warna tangkai daun yang berbeda, yaitu hijau, hijau kekuningan, dan hijau kecokelatan. Bentuk daunnya bulat memanjang (*oblongus*) dengan ujung daun (*apex folii*) meruncing (*acuminatus*) dan pangkal daun (*basis folii*) berbentuk

runcing (*acutus*). Susunan tulang daun kakao berbentuk menyirip (*penninervis*) (Martono, 2014).

Akar 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. Selain itu akar juga memiliki fungsi untuk memperkuat berdirinya suatu tanaman. Tanaman kakao memiliki akar tunggang yang disertai dengan akar serabut dan tumbuh di sekitar permukaan tanah kurang lebih sampai 30 cm. Pertumbuhan akar dapat mencapai 8m ke arah samping dan 15 m ke arah bawah. Ketebalan akar mencapai 30-50 cm. Akar akan tumbuh panjang pada permukaan permukaan air yang rendah. Akar akan tumbuh rendah jika memiliki permukaan air yang dekat dengan permukaan tanah (Martono, 2014).

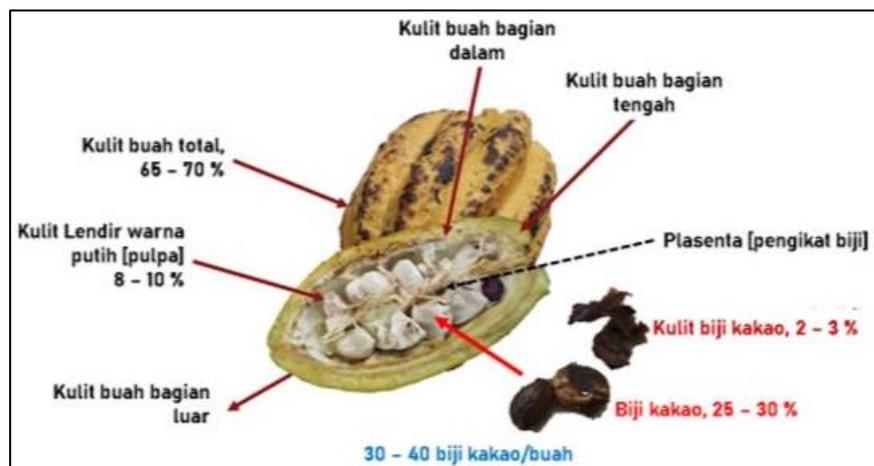
Bunga kakao memiliki ukuran yang kecil dan halus berwarna putih sedikit ungu kemerahan dan tidak berbau. Bunga biji kakao berdiameter 1-2 cm. Bunga kakao termasuk bunga sempurna terdiri dari daun kelopak (*calyx*) sebanyak 5 helai dengan warna merah muda dan benang sari (*androecium*) berjumlah 10 helai. Panjang tangkai bunga mencapai 2-4 cm. Tangkai kakao memiliki warna yang berbeda, diantaranya hijau muda, hijau, kemerahan, merah muda, dan merah. Tanaman kakao dapat menghasilkan bunga sebanyak 6000-10.000 per tahun dan hanya sekitar 5% yang dapat menjadi buah (Martono, 2014).

Buah kakao dibagi menjadi empat golongan, yaitu *Angoleta* (buah berbentuk oblong), *Cundeamor* (buah berbentuk ellips), *Amelonado*, dan *Calabacil* (buah berbentuk bulat). Permukaan buah halus, agak halus, agak kasar, dan kasar. Panjang dari buah kakao bisa mencapai 16,2-20,5 cm dengan diameter 8–10,07 cm. Warna buah juga bervariasi, buah muda memiliki warna merah muda, merah muda keputihan, merah muda kecokelatan, merah kecokelatan, merah kehijauan, merah kusam, merah, merah tua, merah tua mengkilap, hijau muda, hijau muda keputihan, kehijauan, hijau, dan kecokelatan. Sedangkan buah tua/masak berwarna merah kekuningan, kuning kemerahan, kuning cerah, kuning agak kehijau-hijauan, dan orange. Buah kakao terdiri dari 3 komponen utama, yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen terbesar dari buah kakao adalah kulit buah dengan presentasi lebih dari 70 %. Persentase biji kakao dalam buah antara 27-29 % dan sisanya plasenta yang merupakan pengikat dari sekitar 30-40 biji yang terdapat dalam buah (Martono, 2014).



Sumber: (Novia, 2021)
Gambar 2.2 Buah Kakao

Biji kakao berbentuk bulat telur agak pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 cm. Biji kakao diselimuti oleh lendir (*pulp*) yang berwarna putih. Lapisan ini lunak dan memiliki rasa manis, jika telah matang lapisan tersebut dinamakan *pulp* atau *micilage*. *Pulp* dapat menghambat perkecambahan, maka dari itu harus dibuang untuk menghindari kerusakan biji (Martono, 2014). Berdasarkan anatomi buah kakao, komponen terbanyak yaitu kulit buah kakao dengan presentase 65-70 %. Presentase biji kakao sekitar 20-30 % dengan jumlah biji dalam buah 30-40 biji kakao. Komponen pulpa pada buah kakao sekitar 8-10 %. Komponen paling sedikit pada buah kakao adalah kulit biji kakao dengan presentase 2-3 %.



Sumber: (Mulato, 2022)

Gambar 2.3 Anatomi Buah Kakao

Temperatur optimum untuk penyimpanan benih adalah 17°C, jika disimpan pada temperatur dibawah 17°C akan merusak benih dan perkecambahan. Biji kakao bertahan 40-60 % saat dikeringkan pada suhu 10°C. Benih akan bertahan sampai 100 % jika disimpan pada suhu antara 15-30°C selama 3 minggu (Martono, 2014).

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

Penyusun dari biji kakao adalah lemak. Lemak biji kakao merupakan komponen penting dan bisa menjadi penentu dari karakteristik atau mutu kakao. Lemak kakao dikelompokkan menjadi 2, yaitu lemak jenuh dan tidak jenuh. Komposisi dari lemak kakao diantaranya asam palmitat 25 %, asam stearat 35 %, asam oleat 5 %. Biji kakao juga mengandung senyawa alkaloid. Dari senyawa alkaloid terbagi menjadi 2 bentuk senyawa, yaitu teobromin dengan kandungan sebesar 0,7-3 % dan senyawa kafein dengan kandungan sebesar 0,1-0,7 %. Selain itu terdapat senyawa polifenol yang juga terdapat dalam biji kakao. Senyawa ini terbagi menjadi 3 kelompok, yaitu flavan 3- ols sebesar 37%, proantosianidin sebesar 58 %, dan antosianidin sebesar 4 % (Apriyanto, 2021).

Biji kakao yang telah difermentasi memiliki komponen kandungan yang berbeda dengan yang non fermentasi. Berikut komponen kandungan kimia biji kakao fermentasi dan non fermentasi (Laboko & Nurhafsah, 2020):

Tabel 2.1 Komponen Kandungan Kimia Biji Kakao
Sumber: (Laboko & Nurhafsah, 2020)

Komponen	Biji Kakao Non	Biji Kakao
	Fermentasi	Fermentasi
	(%)	(%)
Kulit biji	9,63	9,63
Kecambah	0,77	0,77
Keping biji		
1) Lemak	53,05	54,7
2) Air	3,66	2,1
3) Abu	-	2,7
4) Nitrogen		
(1) Total nitrogen	2,28	2,2
(2) Protein nitrogen	1,50	1,3
(3) Theobromin	0,028	1,4
(4) Kafein	0,188	0,07
5) Karbohidrat		
(1) Glukosa	0,85	0,1
(2) Pati	0,30	6,1

(3) Pectin	8,10	4,1
(4) Serat	2,25	2,1
(5) Selulosa	2,09	1,9
(6) Pentose	1,92	1,2
(7) Gum	1,27	1,8
6) Tanin	0,38	6,2
7) Asam organik		
(1) Asetat	7,57	0,1
(2) Oksalat	0,014	0,3
(3) Sitrat	0,29	0,7

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

1) Antidepresan

Kakao memiliki daya tarik bagi ilmu psikologi. Kakao memiliki fungsi sebagai antidepresan. Perasaan depresi ini karena suasana hati yang tertekan ditandai dengan tidak adanya kepuasan sensorik, sehingga tidak mengherankan jika beberapa penelitian telah menjelaskan hubungan antara kakao dan depresi. Sebagai contoh, satu penelitian mencatat bahwa orang yang mengkonsumsi kakao rentan mengalami depresi yang berulang. Senyawa yang terlibat sebagai antidepresan ini adalah senyawa flavonoid. Senyawa ini terlibat dalam efek antidepresan melalui mekanisme penyangga neuropatologis yang diinduksi oleh radikal bebas, disregulasi sitokin, dan gangguan neuroendokrin (Smith, 2013).

2) Menurunkan Kolesterol darah

Ekstrak biji cokelat mampu menurunkan kolesterol darah karena zat antioksidan flavonoid yang tinggi. Kandungan flavonoid di dalam biji cokelat sekitar 12-18 %. Flavonoid memiliki mekanisme kerja yaitu akan menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh (Zulkifli *et al*, 2016).

Dalam menurunkan kolesterol darah flavonoid memiliki mekanisme kerja dengan cara melakukan penghambatan terhadap HMG-CoA Reduktase. Penghambatan ini dapat menyebabkan penurunan sintesis kolesterol dan dapat meningkatkan jumlah reseptor *low-density lipoprotein* (LDL) sehingga kadar kolesterol total mengalami penurunan (Baskaran *et al*, 2015). Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji coklat mampu menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) plasma pada tikus putih jantan yang hiperkolesterol. Pemberian ekstrak biji coklat dilakukan dengan variasi dosis yaitu 1,8 mg; 3,6 mg; dan 5,4 mg (Zulkifli *et al*, 2016).

3) Antikanker

Kakao selalu dikaitkan dengan senyawa flavonoid, polifenol, dan prosianidin. Aktivitas farmakologis utama dari kakao yang telah dilaporkan salah satunya sebagai anti kanker. Berdasarkan studi yang dilakukan secara *in vitro* senyawa epikatekin, katekin, quersetin, serta rosianidin mampu menurunkan regulasi NF-kB dan AP-1 pada sel kanker (Baharum *et al*, 2016).

Tanaman kakao juga memiliki agen antikanker yang memiliki mekanisme kerja yang berinteraksi dengan siklus sel atau mengaktifkan jalur apoptis (Baharum *et al*, 2016). Apoptosis adalah proses kematian sel yan diatur secara secara genetik dan bersifat aktif (Purwaningsih, 2014).

4) Antibakteri

Biji kakao mengandung senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid termasuk senyawa sekunder terbesar pada tumbuhan (Kurniawan dan Aryana, 2015). Berdasarkan penelitian terhadap bakteri *S. pyogenes* biji kakao memiliki efektivitas sebagai antibakteri karena terdapat senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid memiliki potensi sebagai antibakteri dengan mekanisme kerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan yang ada pada sel bakteri yang menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan dapat menyebabkan kematian sel (Pohan *et al*, 2020).

Senyawa lain yang terlibat sebagai antibakteri dalam biji kakao adalah senyawa polifenol. Hal ini terbukti pada penelitian terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* memiliki aktivitas sebagai antibakteri karena terdapat senyawa polifenol (Tunjung-sari *et al*, 2016). Sebagai antibakteri polifenol memiliki mekanisme kerja melalui beberapa mekanisme yaitu dengan cara mengganggu metabolisme sel bakteri dan menghambat sintesis dinding sel namun hanya bersifat sementara (Cui *et al*, 2012).

Ada juga senyawa flavonoid yang memiliki potensi antibakteri. Hal ini dibuktikan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki efektivitas antibakteri karena adanya senyawa flavonoid. Flavonoid memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan cara merusak

susunan dan menembus ke dalam dinding sel bakteri (Kumalasari dan Suswati, 2015).

2.2 Ekstraksi

2.2.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan zat terlarut dengan zat pelarut sebagaimana teknik pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut antara dua pelarut atau lebih yang saling bercampur. Zat terlarut yang diekstrak akan bersifat tidak larut atau sedikit larut dalam suatu pelarut ada juga yang mudah larut dengan pelarut lain (Sudarwati dan Fernanda, 2019).

Definisi lain tentang ekstraksi yaitu suatu proses yang memiliki tujuan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan menggunakan pelarut yang sesuai dalam standar prosedur ekstraksi. Ekstraksi akan berhenti jika kesetimbangan telah tercapai antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam simplisia. Setelah ekstraksi selesai, pelarut dan simplisia akan dipisahkan dengan cara penyaringan (Sudarwati dan Fernanda, 2019).

2.2.2 Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi digunakan untuk mendapatkan sari atau memisahkan kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam suatu tanaman. Metode ekstraksi digolongkan berdasarkan ada tidaknya proses pemanasan. Pemanasan ini sangat berpengaruh terhadap efektifitas proses ekstraksi dan juga bergantung pada senyawa target yang diharapkan setelah proses ekstraksi

(Sudarwati dan Fernanda, 2019). Berikut ini jenis-jenis ekstraksi yang sering digunakan:

1) Ekstraksi Cara Dingin

Metode dengan cara dingin ini artinya selama proses ekstraksi berlangsung tidak melalui proses pemanasan. Hal ini bertujuan untuk menghindari rusaknya senyawa. Jenis ekstraksi dingin adalah maserasi dan perkolasi (Sudarwati dan Fernanda, 2019). Berikut penjelasan singkat tentang metode ekstraksi maserasi dan perkolasi:

(1) Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cara kerja maserasi yaitu cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, kemudian zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa ini akan terus berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Sudarwati dan Fernanda, 2019).

Metode maserasi memiliki keuntungan yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode ekstraksi tidak melewati proses pemanasan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai. Ekstraksi cara dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi,

meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar (Nurhasnawati *et al*, 2017).

Selain memiliki keuntungan, metode maserasi juga memiliki kerugian. Kerugian metode maserasi yaitu pengerjaan yang lama dan penyariannya kurang sempurna (Febryanto, 2017).

Biji kakao (*Theobroma cocoa L.*) akan diekstraksi dengan metode ekstraksi yang sesuai. Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada senyawa metabolit aktif yang akan diambil atau disarikan memiliki sifat tahan panas atau tidak tahan panas. Ekstraksi metabolit sekunder, yaitu alkaloid pada biji kakao dilakukan secara maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari dengan dilakukan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruangan. Selama maserasi berlangsung dilakukan pengocokan berulang-ulang. Hal ini untuk memastikan keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat didalam cairan. Apabila dalam keadaan diam selama proses maserasi akan menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Sudarwati dan Fernanda, 2019). Selain metode maserasi memiliki prosedur lebih praktis, peralatan yang sederhana, serta tidak memerlukan pemanasan sehinggalah cocok untuk bahan yang tidak tahan panas (Nurhasnawati *et al*, 2017).

Maserasi membutuhkan waktu agar zat aktif dapat terlarut dengan sempurna. Lama waktu maserasi harus cukup agar dapat masuk ke

dalam rongga dan dapat melarutkan semua zat dari serbuk sampel. Lama maserasi 5 hari mendapatkan hasil yang optimal dengan perbandingan waktu maserasi 1 hari dan 3 hari. Lama maserasi 5 hari terbukti memiliki daya hambat bakteri 11,32mm (Haryanti *et al*, 2020).

(2) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi simplisia dengan jalan melewati pelarut yang sesuai secara lambat pada simplisia dalam suatu perkolator. Perkolasi bertujuan agar zat berkhasiat tertarik seluruhnya dan proses ini dilakuakn tanpa pemanasan. pelarut dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, pelarut akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh (Sudarwati dan Fernanda, 2019).

Metode perkolasi memiliki keuntungan yaitu tidak terjadi kejenuhan. Selain itu dengan pengaliran dapat meningkatkan difusi (dengan dialiri cairan penyari sehingga zat seperti terdorong untuk keluar dari sel) (Mauliyanti, 2017).

Selain memiliki keuntungan, metode perkolasi juga memiliki kerugian. Kerugian metode perkolasi yaitu menggunakan banyak pelarut dan juga memiliki resiko cemaran mikroba untuk penyari air karena dilakukan secara terbuka (Mauliyanti, 2017).

2) Ekstraksi Cara Panas

Metode dengan cara panas ini artinya selama proses ekstraksi berlangsung melalui proses pemanasan. Tentunya hal ini akan mempercepat proses ekstraksi dibandingkan dengan cara dingin. Jenis ekstraksi panas adalah refluks, soxhlet, dan infusa (Sudarwati dan Fernanda, 2019). Berikut penjelasan singkat tentang metode ekstraksi refluks, soxhlet, dan infusa:

(1) Refluks

Metode refluks digunakan pada saat melakukan ekstraksi menggunakan pelarut yang mudah menguap. Prinsip dari metode refluks adalah pelarut yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang tadinya dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung (Sudarwati dan Fernanda, 2019).

Keuntungan menggunakan metode refluks adalah ketika kita menggunakan simplisia yang kasar akan cocok menggunakan metode ekstraksi refluks. Hal tersebut menjadi salah satu kelebihan dari metode refluks. Selain itu juga cocok untuk simplisia atau pelarut yang tahan terhadap pemanasan langsung (Mauliyanti, 2017).

Selain memiliki keuntungan, metode refluks juga memiliki kerugian. Kerugian metode refluks yaitu menggunakan banyak pelarut dan juga memiliki resiko cemaran mikroba untuk penyari air karena dilakukan secara terbuka (Febryanto, 2017).

(2) Sokletasi

Sokletasi merupakan proses ekstraksi secara berkesinambungan, pelarut dipanaskan sehingga menguap, uap pelarut akan terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun menyari simplisia dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon. Proses ini akan terus berlangsung hingga zat aktif sempurna yang ditandai dengan beningnya cairan penyari yang melalui pipa sifon atau jika diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis tidak memberikan noda lagi (Mauliyanti, 2017).

Metode sokletasi memiliki keuntungan yaitu dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung. Selain itu juga menggunakan pelarut yang lebih sedikit serta pemanasannya dapat diatur (Mauliyanti, 2017).

Selain memiliki keuntungan, metode sokletasi juga memiliki kerugian. Kerugian metode sokletasi yaitu pelarut didaur ulang, ekstrak yang terkumpul pada wadah bawah terus-menerus dipanaskan sehingga dapat menyebabkan reaksi peruraian oleh panas. Jumlah total senyawa yang diekstraksi akan melampaui kelarutannya dalam pelarut tertentu sehingga dapat mengendap dalam wadah dan membutuhkan volume pelarut yang lebih banyak untuk melarutkannya. Tidak cocok dilakukan dalam skala besar dan

mungkin tidak cocok untuk menggunakan pelarut dengan titik didih yang terlalu tinggi (Mauliyanti, 2017).

(3) Infusa

Infusa merupakan ekstraksi yang menggunakan pelarut air. Proses ini berlangsung selama 15 menit dengan suhu 90°C. Perbandingan bahan dan air yang digunakan adalah 1 : 10, artinya jika berat bahan 10 gr maka volume air sebagai pelarut adalah 100 mL.

Keuntungan menggunakan metode infusa adalah alat yang digunakan sederhana. Selain itu biaya yang dikeluarkan relatif murah (Karim, 2014).

Selain memiliki keuntungan, metode infusa juga memiliki kerugian. Kerugian metode infusa yaitu apabila larutan sudah dingin zat yang tertarik akan mendendap kembali, serta tidak cocok untuk bahan yang tidak tahan panas (Karim, 2014).

2.2.3 Fraksinasi

Fraksinasi memiliki prinsip kerja menarik senyawa pada suatu ekstrak menggunakan 2 pelarut yang tidak saling bercampur. Senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar sedangkan senyawa polar akan larut dalam pelarut polar (Sudarwati & Fernanda, 2019). Fraksinasi atau ekstraksi cair-cair merupakan teknik pemisahan yang memiliki sifat mudah dan cepat. Biasanya dalam pelaksanaan ekstraksi cair-cair ini menggunakan corong pisah yang kemudian mengocok corong pisah yang berisi 2 larutan yang tidak saling bercampur selama beberapa menit (Christina *et al*, 2016).

2.3 Pelarut

Pelarut adalah benda berbentuk cair yang melarutkan benda padat atau cair yang akan menghasilkan larutan. Pelarut organik adalah pelarut yang berasal dari bahan kimia organik atau mengandung karbon. Berdasarkan konstanta dielektrikum pelarut ini dibagi menjadi dua, yaitu pelarut polar dan pelarut non-polar. Pelarut polar diantaranya etanol dan metanol. Sedangkan pelarut non polar adalah kloroform. Semakin tinggi konstanta dielektrikumnya maka semakin polar pelarutnya. Berikut konstanta dielektrum pada pelarut organik (Febryanto, 2017):

Tabel 2.2 Konstanta Dielektrum Pelarut Organik
Sumber: (Febryanto, 2017)

Pelarut	Konstanta Dieletrik
n-heksan	2,0
Etil Asetat	6,0
Kloroform	4,8
Asam Asetat	6,2
Benzen	2,3
Etanol	24,3
Metanol	33,1
Aseton	21
Air	80,1

Pelarut pada maserasi memiliki mekanisme kerja dengan cara menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif yang ada pada sampel akan larut hal ini dikarenakan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan yang terpekat akan terdesak keluar. Proses ini akan terus berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan dalam sel (Suwandi, 2012).

2.3.1 Kloroform

Kloroform merupakan cairan jernih, memiliki rasa manis, dan mudah terbakar. Kloroform mendidih pada suhu 60°C. Kandungan kloroform dalam

suatu cairan adalah 99 %-99,5 %. Kloroform mudah larut dalam etanol, eter, benzene dan sukar larut air (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

2.3.2 Asam Asetat

Asam asetat merupakan cairan jernih, memiliki bau khas, dan rasa asam yang menyengat. Kandungan asam asetat dalam suatu larutan adalah 36 %-37 %. Asam asetat larut dalam air, etanol, dan gliseron (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

2.3.3 Metanol

Metanol memiliki bentuk serbuk berbentuk jarum, tidak berwarna, dan memiliki bau seperti minyak permen. Kandungan metanol dalam suatu larutan adalah 98 %-102 %. Metanol mudah larut dalam etanol, kloroform, eter dan sukar larut dalam air (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

2.3.4 Aseton

Aseton memiliki sifat mudah terbakar. Kandungan aseton didalam larutan aseton adalah 99 %. Aseton merupakan cairan transparan, mudah menguap, dan memiliki bau yang khas. Aseton dapat larut dalam air, etanol, eter, dan kloroform (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

2.3.5 Etanol

Etanol merupakan campuran antaran etil alkohol (C_2H_6O) dan air. Etanol mengandung etil alkohol sebanyak 92,3 % b/b sampai 94,9 % b/b atau mengandung etil alkohol sebanyak 95,9 % v/v sampai 96,0 % v/v. Etanol merupakan cairan yang mudah menguap, jernih atau tidak berwarna, memiliki bau yang khas serta menyebabkan rasa terbakar pada lidah. Etanol dapat

bercampur dengan air dan pada semua jenis pelarut organik (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

Etanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat mengekstrak senyawa yang bersifat non-polar, semi polar, dan polar. Kadar etanol yang digunakan adalah 96 %. Pemilihan kadar ini karena etanol 96 % lebih mudah masuk berpenetrasi ke dalam dinding sel sampel daripada pelarut etanol dengan konsentrasi lebih rendah, sehingga menghasilkan ekstrak yang pekat (Wendersteyt *et al*, 2021). Etanol 96 % dapat menarik senyawa alkaloid total dengan nilai kadar alkaloid total tertinggi dibandingkan dengan etanol dengan konsentrasi yang lebih rendah (Wahyuni dan Marpaung, 2020).

Selain itu, etanol 96 % memiliki komposisi campuran etanol yang lebih banyak daripada air dengan perbandingan 24:1 sebagaimana hal ini berhubungan dengan kepekatan pelarut yang akan mempengaruhi hasil ekstraksi. Etanol dengan konsentrasi 96 % termasuk pelarut yang pekat. Hal ini berarti etanol 96 % dapat menarik zat aktif yang ada di dalam sampel sehingga dapat menghasilkan hasil ekstrak yang lebih besar. Hal ini berhubungan dengan kerangka karbon yang banyak pada struktur alkaloid. Banyaknya kerangka karbon ini menandakan bahwa alkaloid sukar larut dalam air. Oleh karena itu dipilih konsentrasi 96 % karena kandungan airnya lebih sedikit dibandingkan dengan konsentrasi yang lain. (Kurniawati *et al*, 2016).

2.4 Senyawa Alkaloid

2.4.1 Pengertian Alkaloid

Alkaloid adalah golongan metabolit sekunder penting yang dapat ditemukan pada tanaman. Alkaloid yang berasal dari tumbuhan memiliki ciri khas yaitu senyawa bersifat basah. Pada tahun 1886 alkaloid pertama yang disintesis adalah *coniine* dari *Conium maculatum*. Di paruh abad ke-20, terjadi perkembangan metode ekstraksi. Tentu saja hal ini akan mempermudah dalam penelitian. Alkaloid dari tumbuhan menjadi sangat menonjol dalam dunia perobatan (Julianto, 2019).

2.4.2 Sifat Umum Alkaloid

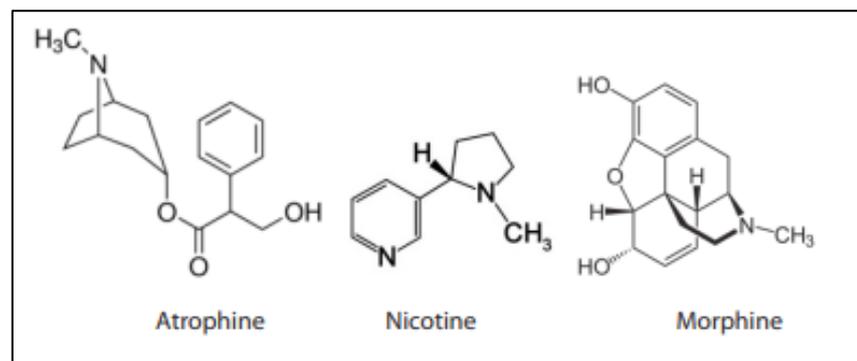
Pada umumnya alkaloid memiliki rasa yang pahit, bersifat basa lemah, dan sedikit larut dalam air serta dapat larut dalam pelarut organik. Pada tumbuhan alkaloid banyak terdapat dalam biji dan akar. Alkaloid akan mengalami pemisahan yang disebabkan oleh suhu yang panas. Sebagian alkaloid memiliki warna kuning seperti berberin dan warna merah seperti garam sanguinarine dengan tembaga. Berdasarkan wujud kebanyakan alkaloid berbentuk padatan kristal dan sedikit diantaranya merupakan padatan amorf (Julianto, 2019). Alkaloid memiliki siklik yang mengandung nitrogen dan juga mengandung variasi substituen, yaitu gugus amina, amida, fenol, dan metoksi (Wahab *et al*, 2020).

2.4.3 Klasifikasi Alkaloid

Berdasarkan kerangka karbonnya alkaloid diklasifikasikan menjadi 3, yaitu:

1) *True alkaloid*

Alkaloid jenis ini memiliki bentuk kerangka cincin heterosiklik. Didalam alkaloid ini mengandung atom nitrogen. Adapun biosintesis dari alkaloid jenis ini yaitu berasal dari asam amino-asam amino. Contohnya *Atrophine, Nicotine, Morphine* (Julianto, 2019).

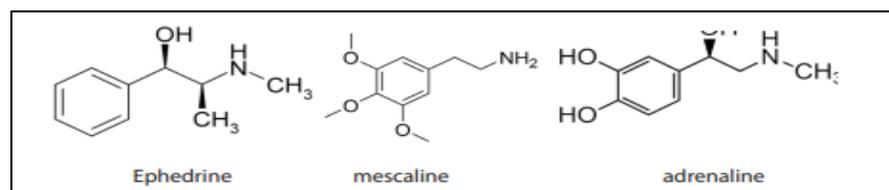


Sumber: (Julianto, 2019)
Gambar 2.4 Struktur Senyawa *True Alkaloid*

2) *Protoalkaloid*

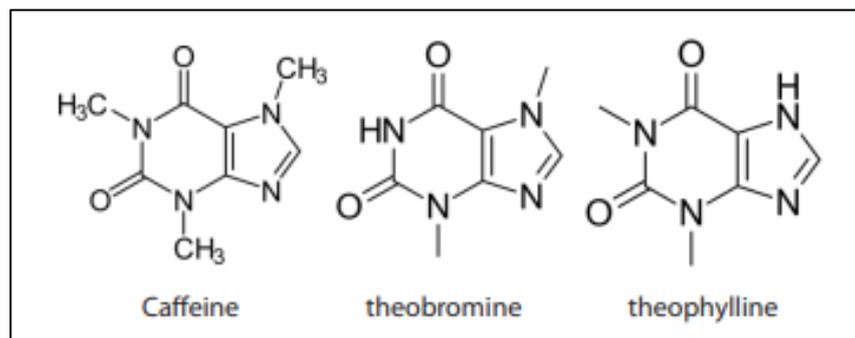
Alkaloid jenis ini tidak memiliki cincin heterosiklik seperti alkaloid sebenarnya. Hal ini berarti alkaloid ini tidak mengandung atom nitrogen. Contohnya *Ephedrine, Mescaline, Adrenaline* (Julianto, 2019).

Sumber: (Julianto, 2019)
Gambar 2.5 Struktur Senyawa *Protoalkaloid*



3) *Pseudoalkaloid*

Alkaloid jenis ini mengandung cincin heterosiklik sama seperti alkaloid sebenarnya. Hal ini berarti alkaloid ini mengandung atom nitrogen, namun bukan merupakan turunan dari asam amino. Contohnya *Caffeine*, *Theobromine*, *Theophylline* (Julianto, 2019).



Sumber: (Julianto, 2019)

Gambar 2.6 Struktur Senyawa *Pseudoalkaloid*

Alkaloid juga dapat diklasifikasikan dengan beberapa faktor yaitu berdasarkan biosintesisnya, kerangka struktur kimia, farmakologi, dan taksonomi. Berikut klasifikasi alkaloid berdasarkan biosintesisnya, kerangka struktur kimia, farmakologi, dan taksonomi (Julianto, 2019):

Tabel 2.3 Klasifikasi Alkaloid

Sumber: (Julianto, 2019)

Biosintesis	Kerangka		
	Struktur Kimia	Farmakologi	Taksonomi
1) Indol	1) Tropan	1) Morfin	1) Kanabinasus
2) Piperidin	2) Kuinolin	2) Kuinin	2) Rubiasus
3) Pirolidin	3) Purin	3) Lobelin	3) Solanasus
4) Peniletilamin	4) Diterpen	4) Akonitin	
5) Imidazol	5) Steroidal	5) Ergonofin	

2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.5.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis atau KLT merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara tepat dan sederhana. Pemisahan yang terjadi pada KLT berdasarkan pada adsorpsi dan partisi tergantung pada jenis lempeng, fase diam dan gerak yang digunakan. KLT banyak digunakan untuk tujuan identifikasi karena cara yang sederhana dan mudah, serta memberikan pilihan fase gerak yang lebih beragam (Hujjatusnaini *et al*, 2021).

Bagian-bagian dari kromatografi lapis tipis, yaitu (Hujjatusnaini *et al*, 2021):

- 1) Lempengan kromatologi, lempeng terbuat dari aluminium atau kaca dengan ukuran umumnya 20 x 20 cm, tebal lapisan 0,10-0,25 mm. Lempeng siap pakai banyak tersedia dalam perdagangan, atau dapat disiapkan sendiri. Untuk tujuan preparatif, lempeng 32 yang dipakai atau digunakan memiliki ketebalan lapisan hingga 1 mm.
- 2) Rak penyimpanan, rak penyimpanan berfungsi untuk meletakkan lempeng apabila perlu pemanasan untuk mengaktifkan fase daun.
- 3) Bejana Kromatografi. Bejana digunakan sebagai tempat untuk meletakkan lempeng pada posisi tegak, bagian bawahnya datar, tempat sejumlah fase pengembangan, sedangkan bagian atasnya dapat ditutup dengan rapat. Ukuran bejana yang akan dipakai dapat

disesuaikan dengan ukuran lempeng yang digunakan. Penjenuhan bejana diperlukan untuk memperoleh pemisahan yang baik.

- 4) Pipet mikro (*micro-syringe*). Pipet digunakan untuk menotolkan larutan bahan uji dan larutan pembanding dalam jumlah yang dihendaki, contohnya 10 dan 20 μL .
- 5) Alat penyemprot pereaksi atau larutan deteksi. Alat ini umumnya terbuat dari kaca dan digunakan untuk menyemprotkan pereaksi ke lempeng. Larutan yang keluar dalam bentuk butir-butir halus.
- 6) Lampu ultraviolet. Lampu digunakan untuk melakukan pengamatan lempeng dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Sinar UV 254 nm akan menghasilkan lempeng KLT yang memancarkan dan menyerap cahaya dan sampel akan tampak berwarna gelap. Sedangkan sinar UV 366 nm noda akan memancarkan dan menyerap cahaya dan lempeng KLT akan tampak berwarna gelap (Karima *et al*, 2019).

2.5.2 Kelebihan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kelebihan kromatografi lapis tipis sebagai berikut (Kemendikbud, 2018):

- 1) Kromatografi lapis tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis.
- 2) Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet.
- 3) Dapat dilakukan elusi secara menaik (*ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi 2 dimensi.

- 4) Dapat untuk memisahkan senyawa hidrofobik (lipid dan hidrokarbon) yang dengan metode kertas tidak bisa.
- 5) Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.
- 6) Hanya membutuhkan sedikit pelarut.
- 7) Waktu analisis yang singkat (15-60 menit)
- 8) Biaya yang dibutuhkan sedikit
- 9) Preparasi sampel yang mudah
- 10) Kemungkinan hasil palsu yang disebabkan oleh komponen sekunder tidak mungkin
- 11) Kebutuhan ruangan minimum

2.5.3 Fase Diam

Fase diam yang digunakan adalah bahan penyerap (*adsorbent*). Fase diam untuk Kromatografi Lapis Tipis memiliki sifat yang sama dengan yang digunakan untuk Kromatografi Kolom. Ada hal penting yang harus diperhatikan untuk Kromatografi Lapis Tipis adalah besar/kecilnya (ukuran) serta homogenitasnya, karena daya pisahnya sangat ditentukan oleh kedua sifat tersebut. Partikel yang kasar tidak dapat memberikan pemisahan yang baik dan untuk memperbaikinya dapat digunakan butiran yang halus. Besar partikel yang biasa digunakan adalah 1–25 mikron.

Beberapa fase diam yang sering digunakan dalam kromatografi lapis tipis, yaitu (Kemendikbud, 2018):

1) Silika gel

Silika gel sering digunakan dan memiliki sifat asam. Zat pengikat yang biasanya digunakan untuk memberikan kekuatan pada lapisan dan menambah adisi adalah kalsium sulfat (CaSO_4). Dalam jual beli silika gel biasanya sudah diberi zat pengikat seperti Silika gel "G" *Merck*.

2) Alumina

Alumina memiliki daya serap yang tidak sekuat silika gel. Tidak cocok untuk memisah senyawa asam-asam karena ada diikat oleh fase diam dan sangat susah bergerak.

3) Selulosa

Fase diam seperti ini dapat digunakan dengan atau tanpa bahan pengikat. Pada Kromatografi Lapis Tipis, fase diam ini terdapat butiran-butiran yang halus dan memiliki ukuran yang sama, berbeda pada kromatografi kertas sebagaimana selulosa berupa serabut.

4) *Sephadex*

Fase diam ini digunakan pada Kromatografi Lapis Tipis mempunyai ukuran 10-40 μm . Biasanya digunakan untuk pemisahan zat yang memiliki ukuran molekul yang besar seperti protein, hormon, enzim, asam amino dan lain-lain.

2.5.4 Fase Gerak

Fasa gerak dalam kromatografi berfungsi sebagai pembawa komponen campuran, komponen campuran akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda hal ini diakibatkan oleh hambatan dari fase diam sehingga terjadi pemisahaan.

Fasa gerak dalam kromatografi dapat berupa pelarut tunggal atau campuran beberapa pelarut dengan komposisi tertentu. Pelarut dapat berupa pelarut polar dan pelarut non polar. Fasa gerak atau disebut juga eluen. Jenis eluen yang digunakan pada kromatografi dipilih supaya senyawa yang berbeda dapat dipisahkan secara efektif (Kemendikbud, 2018).

Memilih fase gerak dilakukan dengan cara membaca berbagai literatur yang sebelumnya sudah dilakukan atau dengan cara *trial and error* atau mencoba-coba sendiri (Sabiladiyuni *et al*, 2018). Pemilihan fase gerak sangat penting dalam KLT. Berikut pedoman dan tabel untuk menemukan fase gerak (Errors & Sittisaree, 2023):

- 1) Lakukan uji titik untuk membandingkan sistem pelarut yang berbeda
- 2) Pelarut tunggal jarang digunakan dalam KLT, kebanyakan sistem pelarut mengandung beberapa komponen, tetapi tetap dengan komponen yang sederhana
- 3) Sistem pelarut harus mampu membasahi lapisan lempeng KLT
- 4) Gunakan kemurnian pelarut yang sesuai
- 5) Mencari literatur ilmiah atau monografi farmakope untuk memudahkan pencarian penelitian

Pada tabel di bawah ini, komponen pelarut dalam urutan peningkatan kekuatan elusi. Semakin kebawah kekuatan elusi suatu fase gerak semakin tinggi.

Tabel 2.4 Urutan Pelarut Berdasarkan Kekuatan Elusi
 Sumber: (Errors & Sittisaree, 2023)

	Pelarut	Kecepatan koefisien (mm ² /s)
Kekuatan elusi rendah	n-Heptana	11,4
	n-Heksana	14,6
	n-Pentana	13,9
	Sikloheksana	6,7
	Toluena	11,0
	Kloroform	11,6
	Diklorometana	13,2
	Diisopropil eter	13,2
	tert-Butanol	1,1
	Dietil eter	15,3
	Isobutanol	1,6
	Asetonitril	15,4
	Isobutil metil keton	9,1
	2-Propanol	2,5
	Etil asetat	12,1
	1-Propanol	2,9
Kekuatan elusi tinggi	Etil metil keton	13,9
	Aseton	16,2
	Etanol	4,2
	1,4-Dioksan	6,5
	Tetrahidrofuran	12,6
	Metanol	7,1
	Piridin	8,0

Berdasarkan tabel diatas kekuatan elusi pelarut berhubungan dengan pemisahan komponen pada plat KLT. Semakin tinggi kekuatan elusi suatu pelarut maka komponen akan terpisah dengan baik. Pemisahan ini ditandai dengan bercak noda pada plat KLT (Wulandari, 2011).

Kecepatan koefisien adalah kecepatan perpindahan komponen oleh pelarut yang melewati plat KLT. Semakin besar nilai kecepatan koefisien maka semakin cepat waktu perpindahan komponen oleh pelarut (Wulandari, 2011).

2.5.5 Penetapan Harga R_f

Faktor retensi atau R_f adalah jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen. Nilai R_f sangat penting untuk senyawa tertentu pada eluen tertentu. Hal tersebut berfungsi untuk mengidentifikasi

adanya perbedaan senyawa dalam sampel. Senyawa yang mempunyai R_f lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang rendah, sebaliknya senyawa yang memiliki R_f lebih kecil memiliki kepolaran yang tinggi. Hal tersebut dikarenakan fase diam yang bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan terikat pada fasa diam, sehingga menghasilkan nilai R_f yang rendah. Nilai R_f yang baik pada KLT berkisar antara 0,2 - 0,8 (Kemendikbud, 2018).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

2.6 Densitometri

Densitometri merupakan parameter kuantitatif yang menggunakan tinggi puncak kurva densitometri dan area di bawah puncak kurva densitometri. Densitometri merupakan metode analisis instrumental yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode tersebut disebut metode KLT-Densitometri (Wulandari, 2011).

Densitometri adalah alat untuk mengukur konsentrasi zona kromatografi pada KLT. Alat ini dikembangkan tanpa mengganggu zat yang telah dipisahkan. Densitometri dikendalikan oleh komputer integral yang memberikan hasil akurat (Wall, 2005).

Dasar dari teknik densitometri adalah memancarkan radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya dan melintasi zona kromatografi. Kemudian dilanjutkan dengan pemindaian plat KLT. Instrumen dapat diprogram untuk memindai diberbagai panjang gelombang dan memindai secara otomatis semua trek zona kromatografi pada lapisan yang totolkan. Pemindaian trek zona kromatografi ini biasanya menampilkan serangkaian puncak

dengan resolusi dasar di mana zona dipisahkan dengan baik. Kemurnian zona kromatografi juga dapat diperiksa dengan mengambil spektrum penuh di awal, puncak, dan akhir puncak. Jika spektrumnya identik, maka puncaknya dianggap memiliki kemurnian tinggi (Wall, 2005).

Bagian-bagian dari densitometry, yaitu (Estetika, 2017):

1) Detektor

Detektor yang digunakan pada alat TLC Scanner 3 CAMAG adalah *photomultipliers* (PMT). Komponen dari PMT adalah *photomultiplier tube* (tabung vakum photomultiplier), *photocathode* (katoda metalik yang terbuat dari bahan logam multi alkali), struktur *dynode* (berbentuk lempengan cekung) dan anoda (memiliki *spectral sensitivity* 185-850 nm). PMT memiliki prinsip kerja permukaan logam katoda disinari dengan seberkas cahaya dan sejumlah elektron terpancar dari permukaannya atau disebut dengan efek fotoelektrik dengan kondisi hampa udara.

2) Monokromator

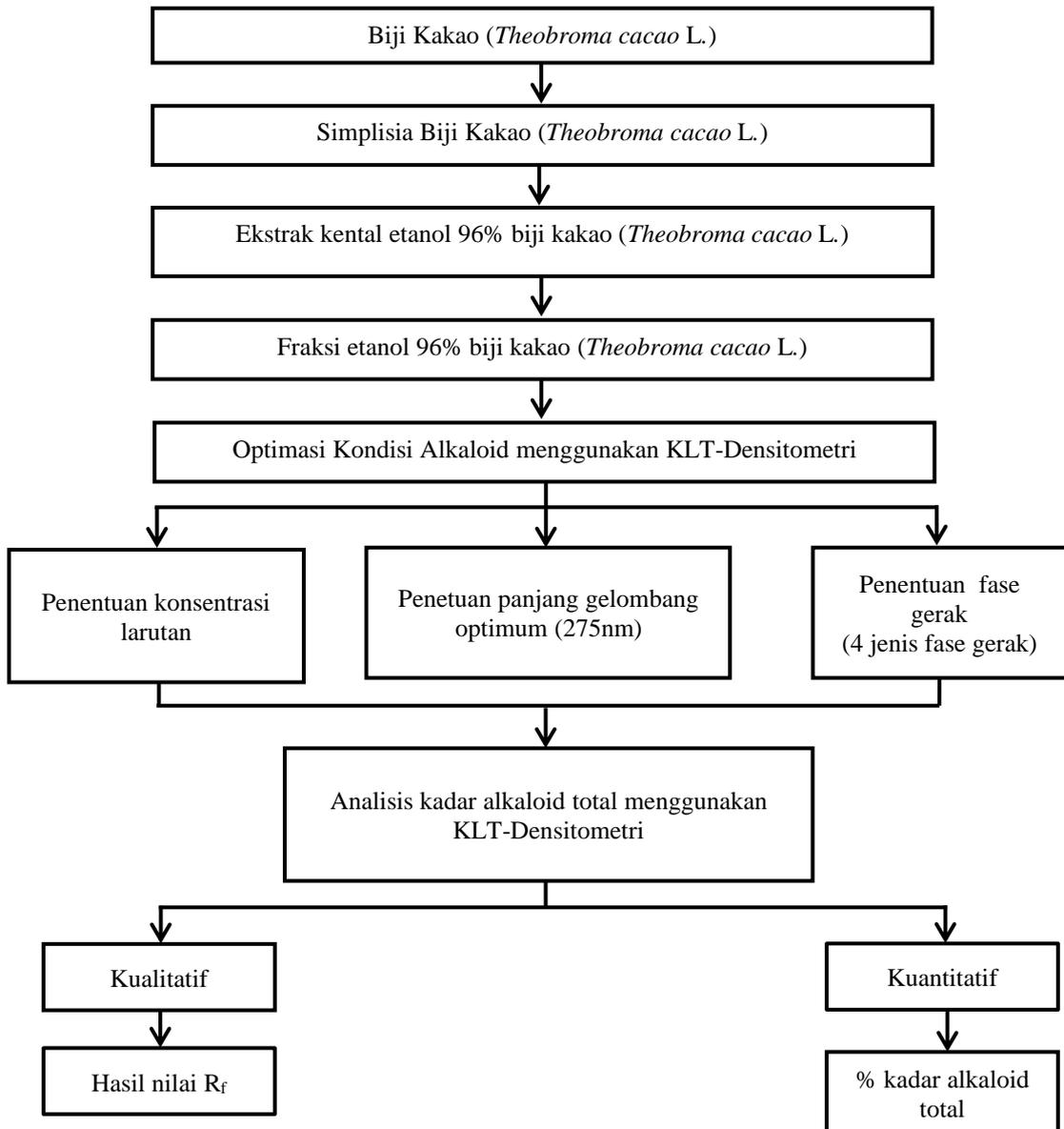
Monokromator merupakan alat yang paling sering digunakan untuk menghasilkan berkas radiasi dengan satu panjang gelombang. Monokromator untuk radiasi ultra violet, sinar tampak dan infra merah adalah serupa, yaitu mempunyai celah (*slit*), lensa, cermin dan prisma atau grating. Prisma memiliki fungsi untuk memisahkan sinar polikromatis dari sumber cahaya menjadi sinar monokromatis. Bila seberkas cahaya dilewatkan melalui sebuah prisma, maka cahaya tersebut akan diuraikan menjadi beberapa warna (terdapat berbagai warna merah, jingga, hijau, biru, dan lain-lain).

3) Absorbansi

Penyerapan ini terjadi jika energi foton yang datang cocok dengan energi yang diperlukan untuk memindahkan satu elektron terluarnya dari tingkat dasar ke tingkat tereksitasi (atau dari pita valensi ke pita konduksi di dalam zat padat). Berkas radiasi elektromagnetik bila dilewatkan pada sampel kimia maka sebagian akan terabsorpsi. Energi elektromagnetik yang ditransfer ke molekul sampel akan menaikkan tingkat energi (tingkat tereksitasi). Molekul akan dieksitasi sesuai dengan panjang gelombang yang diserapnya.

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya hubungan serta pengaruh antara variabel bebas (*independent*) dengan variabel terikat (*dependent*) (Ekasari, 2018). Hipotesis penelitian ini adalah terdapat alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang memenuhi syarat nilai R_f 0,2-0,8 cm.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian adalah perencanaan yang dilakukan pada suatu penelitian. Desain penelitian berkaitan erat dengan proses penelitian (Abdussamad, 2021). Desain penelitian ini adalah deskriptif laboratorium secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian deskriptif laboratorium merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium untuk mendeteksi kandungan atau kadar pada suatu sampel (Sari, 2019).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi adalah wilayah dari topik penelitian yang terdiri dari subjek atau objek dan telah memenuhi syarat-syarat tertentu yang berkaitan pada unit penelitian yang akan diteliti (Abdussamad, 2021). Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Jalan Perkebunan Renteng, Kecamatan Jenggawah Kabupaten Jember.

4.2.2 Sampel

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang diambil menurut prosedur tertentu sehingga dapat mewakili populasinya (Abdussamad, 2021). Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian biji dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao

yang berada di Jalan Perkebunan Renteng, Kecamatan Jenggawah Kabupaten Jember.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi sebab terjadinya perubahan dari variabel terikat (*independent*) (W. Ningsih *et al*, 2021). Variabel bebas pada penelitian ini adalah optimasi kondisi analisis terdiri dari penentuan konsentrasi, penentuan panjang gelombang optimum, dan penentuan fase gerak.

4.3.2 Variabel Terikat (*Dependent*)

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas (*dependent*) (W. Ningsih *et al*, 2021). Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar alkaloid total menggunakan KLT-Densitometri terdiri dari hasil nilai R_f dan hasil perhitungan kadar alkaloid total.

4.4 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas dr. Soebandi.

4.5 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dimulai bulan Maret-Mei 2023.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah suatu sifat dari orang, objek, atau kegiatan yang mempunyai ciri untuk dipelajari dan telah ditetapkan oleh peneliti sehingga didapatkan sebuah keterangan mengenai sesuatu yang akhirnya dapat ditarik

kesimpulan (Aridiyanto dan Penagsang, 2022). Definisi operasional dari penelitian ini sebagai berikut:

Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas (<i>Independent</i>)					
Penentuan Fase Gerak	Hasil penentuan fase gerak merupakan suatu tindakan dalam membandingkan komposisi dan volume eluen terbaik sehingga diperoleh hasil pemisahan yang maksimal	KLT-Densitometri	Mencampur fase gerak sesuai dengan perbandingan volume. Kemudian menjenuhkan fase gerak di dalam <i>chamber</i> dan memasukkan lempeng KLT yang sudah ditotolkan larutan standar dan larutan sampel ke dalam <i>chamber</i> . Setelah itu melihat hasilnya di sinar UV 254 nm	Satuan hasil berupa perbandingan komposisi dan volume (ml)	Ratio
Penentuan Konsentrasi	Hasil penentuan konsentrasi merupakan suatu tindakan dalam memperkirakan kandungan alkaloid total dalam sampel biji kakao	KLT-Densitometri	Membuat larutan stok kafein 2000 ppm yang kemudian diencerkan menjadi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Kemudian larutan ini ditotolkan pada lempeng KLT dan memasukkan ke dalam <i>chamber</i> . Setelah itu melakukan <i>scanning</i> menggunakan densitometer	Satuan hasil dalam ppm	Ratio

Penentuan Panjang Gelombang Optimum	Hasil penentuan panjang gelombang optimum merupakan suatu tindakan dalam memberikan kepekaan dalam sampel biji kakao	KLT-Densitometri	Penentuan Panjang gelombang ini menggunakan larutan standar kafein dengan 5 konsentrasi yang berbeda, yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm yang kemudian melakukan <i>scanning</i> menggunakan densitometer	Satuan hasil dalam nm	Ratio
Variabel Terikat (<i>dependent</i>)					
Nilai R _f	Hasil Nilai R _f merupakan suatu pemisahan dalam menentukan adanya perbedaan senyawa dalam ekstrak etanol biji kakao	KLT-Densitometri	Menotolkan larutan standar kafein dan sampel pada lempeng KLT menggunakan alat penotol yaitu mikropipet. Kemudian mengelusi lempeng KLT pada <i>chamber</i> dan melakukan <i>scanning</i> dengan densitometer	Nilai R _f (0,2-0,8 cm)	Ratio
Nilai % kadar alkaloid total	Hasil nilai % kadar alkaloid merupakan suatu perhitungan dalam menetapkan jumlah alkaloid total dari ekstrak etanol biji kakao	KLT-Densitometri	Menotolkan larutan standar kafein dan sampel pada lempeng KLT menggunakan alat penotol yaitu mikropipet. Kemudian mengelusi lempeng KLT pada <i>chamber</i> dan melakukan <i>scanning</i> dengan densitometer	% kadar alkaloid total	Ratio

4.7 Teknik Pengumpulan Data

4.7.1 Pengambilan Sampel

Sampel biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao di Kabupaten Jember.

4.7.2 Determinasi Tanaman

Determinasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dilakukan di Politeknik Negeri Jember. Tujuan determinasi adalah untuk mengetahui kebenaran dari tanaman yang akan diteliti dan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari kemungkinan tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lain (Klau dan Hesturini, 2021).

4.7.3 Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi maserasi. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang sampel sebanyak 500 gram dan meletakkan dalam toples kaca. Kemudian menambahkan 2 liter etanol 96% hingga semua sampel terendam dan ditutup rapat. Sampel didiamkan selama 5 hari dan terlindung dari cahaya dengan sesekali pengadukan agar proses ekstraksi berjalan maksimal. Kemudian menyaring dan memisahkan ampas dan filtratnya. Kemudian filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *waterbath* pada suhu 50°C. Residu yang diperoleh dari penyaringan awal diremaserasi menggunakan pelarut etanol sebanyak 1 liter. Remaserasi direndam selama 24 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan kembali dan hasil remaserasi dan dipekatkan kembali sama seperti maserasi (Wardani, 2021).

4.7.4 Fraksinasi

Fraksinasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair dilakukan dengan cara menimbang 50 mg ekstrak kental biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Kemudian menambahkan 100 mL aquades dan 1,5 gram CaCO₃. Kemudian menyaring larutan menggunakan kertas saring. Filtrat ditampung dalam *beaker glass* 250 mL. Kemudian filtrat diekstraksi dengan menambahkan 25 mL kloroform didalam corong pisah lalu diekstraksi hingga membentuk 2 lapisan dan hasil pemisahan fase kloroform ditampung. Filtrat ditambahkan lagi 25 mL kloroform dan diekstraksi sebanyak 2 kali dan hasil pemisahan fase kloroform ditampung. Kemudian hasil filtrat kloroform digabungkan dan diuapkan (dalam cawan penguap) di atas *waterbath* sampai fraksi kloroform hilang. Kemudian ditambah dengan 25 mL pelarut etanol 96 % (Fajriana & Fajriati, 2018).

4.7.5 Optimasi Kondisi Analisis KLT-Densitometri

1) Optimasi Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan untuk optimasi fase gerak didasarkan pada penelitian sebelumnya :

- (1) Fase gerak n-heksana : etil asetat : etanol (30:2:1) v/v (Maulana, 2018)
- (2) Fase gerak etil asetat : metanol (2:1) v/v (Laily, 2016)
- (3) Fase gerak kloroform : etanol (95:5) v/v (Budiman *et al*, 2014)
- (4) Fase gerak kloroform : etanol (99:1) v/v (Milanda, 2021)

Fase gerak dicampur sesuai dengan perbandingan volume yang sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Kemudian menjenuhkan fase gerak di dalam *chamber* dan memasukkan lempeng KLT yang sudah ditotolkan larutan standar dan larutan sampel ke dalam *chamber*. Apabila fase gerak sudah sampai batas atas lempeng segera diambil dan dilihat di sinar UV 254 nm.

2) Optimasi Konsentrasi Larutan Standar dan Larutan Sampel

Penentuan konsentrasi yang dipilih yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Pemilihan ini untuk mempermudah preparasi sampel karena konsentrasi uji yang digunakan untuk optimasi merupakan tingkat konsentrasi yang tinggi. Sebelum membuat larutan standar kafein, larutan stok kafein disiapkan terlebih dahulu dengan cara menimbang 50 mg kafein. Kafein dilarutkan dengan kloroform hingga batas tanda di dalam labu ukur 25 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok kafein 2000 ppm. Kemudian larutan standar kafein dibuat dengan cara memipet larutan stok kafein sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL. Kemudian ditambahkan kloroform hingga tanda batas di dalam labu ukur 5 mL sehingga didapat konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Kemudian larutan ini ditotolkan pada lempeng KLT dan memasukkan ke dalam *chamber*. Setelah itu melakukan *scanning* menggunakan densitometer (Stanley, 2018). Larutan sampel pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 2000 ppm.

3) Optimasi Panjang Gelombang Optimum

Panjang gelombang pada penelitian ini dilakukan pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang ini dipilih berdasarkan intensitas spektrum paling tinggi, yaitu 275 nm. Penentuan Panjang gelombang ini menggunakan larutan standar kafein dengan 5 konsentrasi yang berbeda, yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm yang kemudian melakukan *scanning* menggunakan densitometer (Stanley, 2018).

4.7.6 Penetapan Kadar Alkaloid Total menggunakan KLT-Densitometri

1) Aktivasi Lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄

Sebelum aktivasi lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄, lempeng berukuran 20x20 cm dipotong menjadi ukuran 10x10 cm. Kemudian mencuci lempeng dengan metanol. Selanjutnya mengaktivasi menggunakan oven pada suhu 110°C selama 30 menit (Dewi, 2018).

2) Penjenuhan *Chamber*

Fase gerak dituang kedalam dasar bejana/*chamber* dan kertas saring dicelupkan pada fase gerak. Bejana ditutup, lalu fase gerak dibiarkan menguap hingga membasahi kertas saring selama kurang lebih 1 jam atau ketika fase gerak telah mencapai tujuh perdelapan tinggi kertas saring (Depkes RI, 2014).

3) Pembuatan Larutan Sampel

Larutan sampel dibuat dengan cara menimbang 50 mg ekstrak kental etanol 96 % biji kakao, kemudian difraksinasi. Hasil dari fraksinasi

dilarutkan dengan etanol 96 % sebanyak 25 mL (Fajriana & Fajriati, 2018).

4) Penentuan Nilai R_f

Harga R_f adalah perbandingan jarak yang ditempuh zat terlarut dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Nilai R_f yang baik pada KLT berkisar antara 0,2-0,8 cm (Kemendikbud, 2018).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

5) Penentuan Kurva Baku

Larutan standar kafein konsentrasi 200, 400, 600, 800, 1000 ppm dan 3 replikasi larutan sampel ditotolkan dengan volume penotolan 20 μL pada larutan standar kafein dan 100 μL pada larutan sampel menggunakan mikropipet 20 μL . Penotolan dilakukan pada lempeng KLT yang sudah dipotong berukuran 10x10 cm. Lempeng KLT sebelumnya sudah diberi batasan atas dan bawah sepanjang 1 cm dan jarak antar totolan sepanjang 1 cm (Agustin, 2022).

6) Analisa Kadar Alkaloid Total dalam Sampel

Data luas area yang didapat dari densitogram dapat digunakan untuk menghitung persamaan regresi linier. Hasil dari persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung massa dalam sampel, konsentrasi Alkaloid total, dan massa alkaloid total, kemudian dihitung kadar alkaloid total dalam dengan rumus (Alzanado *et al*, 2022):

$$\text{Kadar Alkaloid Total} = \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$\% \text{ Kadar Alkaloid Total} = \text{Kadar alkaloid total} \times 100\%$$

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Data Umum

5.1.1 Determinasi Tanaman Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

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

5.1.2 Ekstraksi Maserasi

Dari proses ekstraksi maserasi yang telah dilakukan pada sampel biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diperoleh hasil seperti pada tabel 5.1:

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Hasil Ekstrak Kering	Hasil Penimbangan
Berat serbuk simplisia	500 gram
Berat vial kosong	15,41 gram
Berat vial + ekstrak kental	49,96 gram
Berat ekstrak kental	34,55 gram
% Rendemen	6,91 %

5.1.3 Fraksinasi

Dari proses fraksinasi yang telah dilakukan pada sampel biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diperoleh hasil seperti pada tabel 5.2:

Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Rendemen Fraksinasi

Massa Ekstrak Kental	Massa Fraksi	Rendemen
50 mg	2,7 mg	5,4 %

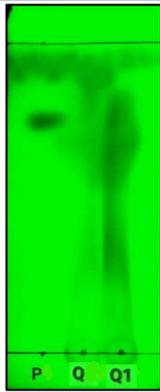
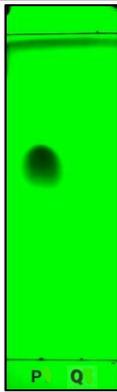
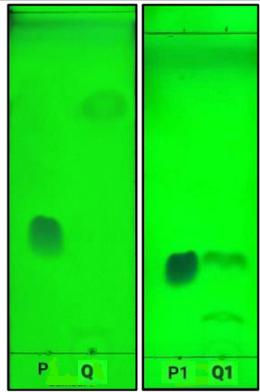
5.2 Data Khusus

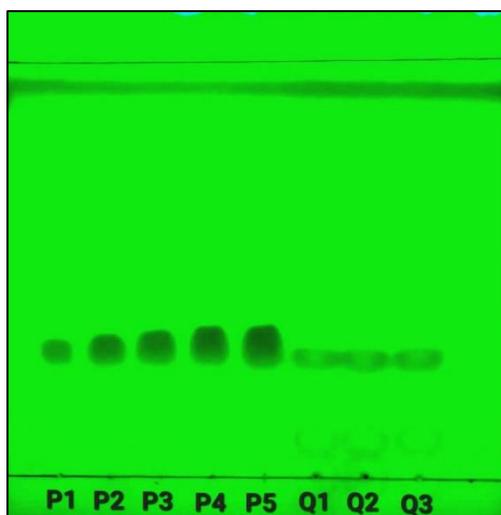
5.2.1 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Alkaloid Total

1) Optimasi Fase Gerak

Optimasi fase gerak pada penelitian ini dilakukan dengan berbagai jenis campuran pelarut dan perbandingan volume yang berbeda. Hasil optimasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Optimasi Fase Gerak

	I	II	III	IV
Jenis Fase Gerak	Fase Gerak n-Heksana : Etil Asetat : Etanol (30:2:1) v/v	Fase Gerak Etil Asetat : Metanol (2:1) v/v	Fase Gerak Kloroform : Etanol (95:5) v/v	Fase Gerak Kloroform : Etanol (99:1) v/v
Gambar				
Keterangan	1) P= Standar kafein 1000 ppm 2) Q= Sampel 1000 ppm	1) P= Standar kafein 1000 ppm 2) Q= Sampel 1000 ppm replikasi 1 3) Q1= sampel replikasi 2 2000 ppm	1) P= Standar kafein 1000 ppm 2) Q= Sampel 1000 ppm	1) P= Standar kafein 1000 ppm 2) Q= Sampel 1000 ppm 3) P1= Standar 1000 ppm 4) Q1= Sampel 2000 ppm
Hasil	Noda tidak sejajar	Noda tidak sejajar dan berpisah dengan sempurna	Noda tidak sejajar	1) Gambar P dan Q Noda tidak sejajar 2) Gambar P dan Q1 Noda Sejajar



Gambar 5.1 Fase gerak klorofom:etanol (99:1) v/v

Pada fase gerak klorofom:etanol (99:1) v/v diperoleh hasil noda yang sejajar dan memisah secara seksama serta memisah sesuai dengan rentang nilai R_f 0,2-0,8 cm. Keterangan Gambar 5.1 sebagai berikut:

- (1) P1-P5= Standar kafein dengan konsentrasi 200 (P1), 400 (P2), 600 (P3), 800 (P4), dan 1000 (P5) ppm.
- (2) Q1-Q3= Sampel biji kakao (*Theobroma cacao* L.) 3 kali replikasi dengan konsentrasi 2000 ppm

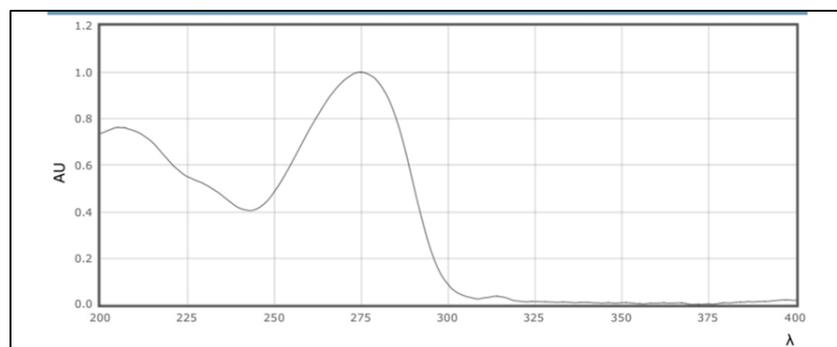
2) Optimasi Konsentrasi Larutan Standar dan Larutan Sampel

Optimasi konsentrasi larutan standar pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dengan volume penotolan 20 μ L dan konsentrasi sampel dengan 3 replikasi menggunakan konsentrasi 2000 ppm dan volume penotolan 100 μ L.

3) Optimasi Panjang Gelombang Optimum

Optimasi panjang gelombang pada penelitian ini dilakukan pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Hasil optimasi panjang

gelombang optimum pada penelitian ini adalah 275 nm. Hasil optimasi panjang gelombang dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Panjang Gelombang Optimum (275 nm)

5.2.2 Penetapan Kadar Alkaloid Total

1) Hasil Nilai R_f

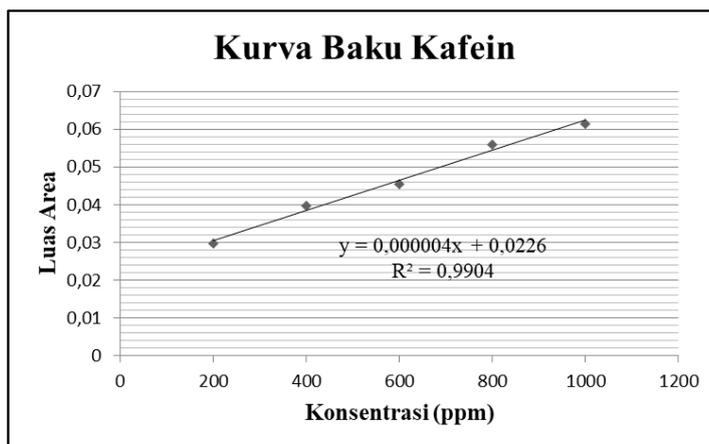
Penelitian ini menggunakan 5 seri standar dan 3 replikasi sampel yang dielusi dengan fase gerak kloroform : etanol (99:1) v/v. Nilai R_f diperoleh hasil seperti pada Tabel 5.4 sebagai berikut:

Tabel 5.4 Data Nilai Luas Area dan Nilai R_f

Vial	Luas Area	R_f	Korelasi
Standar 1 (200 ppm)	0,02977	0.319	0.997766
Standar 2 (400 ppm)	0,03978	0.326	0.997766
Standar 3 (600 ppm)	0,04548	0.328	0.998540
Standar 4 (800 ppm)	0,05585	0.330	0.999541
Standar 5 (1000 ppm)	0,06145	0.333	0.999923
Replikasi 1 (2000 ppm)	0.03939	0.335	0.998492
Replikasi 2 (2000 ppm)	0.03851	0.300	0.998177
Replikasi 3 (2000 ppm)	0.03799	0.297	0.997952

2) Hasil Kurva Baku

Penelitian ini menggunakan 5 seri standar . Masing-masing standar memiliki konsentrasi yang berbeda, yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Dari data tersebut didapatkan hasil regresi linier yang dapat dilihat pada Gambar 5.3 sebagai berikut:



Gambar 5.3 Kurva Baku Kafein

3) Hasil Penetapan Kadar Alkaloid Total

Penelitian ini didapatkan hasil nilai kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diperoleh hasil seperti pada Tabel 5.5 sebagai berikut:

Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Kadar Alkaloid Total

Konsentrasi	Luas Area	x (mg)	% Kadar Alkaloid Total (b/b)	Rata-Rata % Kadar Alkaloid Total (b/b)	%RSD
Replikasi 1 (2000 ppm)	0.03939	0,0041975	2,098 %		
Replikasi 2 (2000 ppm)	0.03851	0,0039775	1,988 %	2,003 % ± 0,001	4,99 %
Replikasi 3 (2000 ppm)	0.03799	0,0038475	1,924 %		

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Determinasi dan Ekstraksi Sampel Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

6.1.1 Determinasi Tanaman Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kebenaran dari tanaman yang akan diteliti dan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari kemungkinan tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lain (Klau dan Hesturini, 2021). Hasil determinasi tanaman di Politeknik Negeri Jember menyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan adalah bagian biji dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.). Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

6.1.2 Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi

1) Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi maserasi. Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada senyawa metabolit aktif yang akan diambil atau disarikan memiliki sifat tahan panas atau tidak tahan panas. Selain itu, metode maserasi memiliki prosedur lebih praktis, peralatan yang sederhana, serta tidak memerlukan pemanasan sehingga cocok untuk bahan yang tidak tahan panas (Nurhasnawati *et al*, 2017). Senyawa metabolit yang dilakukan pada penelitian ini adalah alkaloid. Alkaloid memiliki sifat yang tidak tahan panas dan akan mengalami pemisahan jika terkena suhu yang tinggi (Julianto, 2019).

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi maserasi adalah etanol 96 %. Pelarut ini memiliki sifat universal sehingga dapat mengekstrak senyawa yang bersifat non-polar, semi polar, dan polar. Kadar etanol yang digunakan adalah 96 %. Pemilihan kadar ini karena etanol 96 % memiliki komposisi campuran etanol yang lebih banyak daripada air dengan perbandingan 24:1. Hal ini berhubungan dengan kepekatan pelarut yang akan mempengaruhi hasil ekstraksi yang berarti etanol 96 % dapat menarik zat aktif yang ada di dalam sampel sehingga dapat menghasilkan hasil ekstrak yang lebih besar. Hal ini berhubungan dengan kerangka karbon yang banyak pada struktur alkaloid. Banyaknya kerangka karbon ini menandakan bahwa alkaloid sukar larut dalam air. Oleh karena itu dipilih konsentrasi 96 % karena kandungan airnya lebih sedikit dibandingkan dengan konsentrasi yang lain. (Kurniawati *et al*, 2016).

Selama proses ekstraksi dilakukan pengadukan yang bertujuan memastikan keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat di dalam cairan. Apabila dalam keadaan diam selama proses maserasi akan menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Sudarwati dan Fernanda, 2019). Setelah proses maserasi akan dilanjutkan dengan proses remaserasi. Remaserasi dilakukan untuk memaksimalkan penyaringan dari maserasi pertama (Anjaswati *et al*, 2021). Untuk mendapatkan ekstrak kental perlu dilakukan pemanasan menggunakan *waterbath* dengan suhu 50°C. Pemilihan suhu 50°C karena titik didih etanol 78,4°C

sehingga memilih suhu yang lebih rendah karena senyawa metabolit yang akan digunakan tidak tahan terhadap panas (Nudiasari *et al*, 2019).

Hasil akhir yang berupa ekstrak kental yang selanjutnya akan dihitung rendemen dari ekstrak kental biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Penentuan rendemen bertujuan untuk mengetahui kadar senyawa metabolit yang terlarut oleh pelarut, namun tidak menentukan jenis senyawa metabolit yang terlarut oleh pelarut (Sari *et al*, 2020). Syarat rendemen ekstrak yang baik adalah lebih dari 10 % (Kemenkes RI, 2017). Faktor yang mempengaruhi hasil rendemen salah satunya adalah lama waktu maserasi (Senduk *et al*, 2020).

Pada penelitian ini diperoleh hasil rendemen sebesar 6,91 %. Nilai rendemen pada penelitian ini kurang dari 10 %. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nuraskin *et al* (2022) diperoleh hasil rendemen ekstrak kental pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) sebesar 4,75 % dengan lama waktu maserasi 3 hari.

Faktor yang mempengaruhi kecilnya nilai rendemen salah satunya adalah lama waktu maserasi. Semakin lama waktu maserasi akan semakin tinggi nilai rendemen yang akan dihasilkan karena pelarut yang masuk kedalam sel tumbuhan akan semakin baik yang mengakibatkan semakin banyak senyawa yang tertarik keluar sel.

2) Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa kimia dan dikelompokkan berdasarkan kepolaran suatu pelarut. Metode ini memiliki kelebihan salah satunya adalah dapat memisahkan suatu senyawa berdasarkan kepolarannya sehingga senyawa yang memiliki sifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang non polar akan larut dalam pelarut non polar (Putri *et al*, 2023). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa utama yang akan diteliti. Fraksinasi dilakukan agar menghilangkan zat pengotor yang ada di dalam ekstrak (Amalia & Arsito, 2017).

Fraksinasi memiliki prinsip kerja menarik senyawa pada suatu ekstrak menggunakan 2 pelarut yang tidak saling bercampur (Sudarwati & Fernanda, 2019). Fraksinasi atau ekstraksi cair-cair merupakan teknik pemisahan yang memiliki sifat mudah dan cepat. Biasanya dalam pelaksanaan ekstraksi cair-cair ini menggunakan corong pisah yang kemudian mengocok corong pisah yang berisi 2 larutan yang tidak saling bercampur selama beberapa menit (Christina *et al*, 2016).

Fraksinasi pada penelitian ini dilakukan dengan penambahan CaCO_3 . Penambahan CaCO_3 bertujuan untuk memutus ikatan alkaloid dengan senyawa lain, sehingga alkaloid dalam keadaan basa bebas dan juga menambah kloroform yang bertujuan untuk mengikat alkaloid dalam keadaan basa bebas karena kloroform termasuk pelarut ekstraksi yang tidak dapat bercampur dengan pelarut awal (Fajriana & Fajriati, 2018).

Faktor yang mempengaruhi fraksinasi diantaranya jenis pelarut dan replikasi pengocokan. Jika menggunakan jenis pelarut yang tidak sesuai dengan kepolaran suatu sampel maka senyawa tidak akan terpisah dengan baik. Replikasi pengocokan bertujuan untuk menarik sisa senyawa pada pengocokan pertama (Putra *et al*, 2015).

Hasil rendemen fraksinasi pada penelitian ini adalah 5,4 %. Hasil ini masih < 10%. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan penelitian sebelumnya diperoleh hasil 0,216 % dengan replikasi 1 kali (Marfuah *et al*, 2019).

Salah satu faktornya adalah replikasi pengocokan. Fraksinasi memiliki prinsip akan terjadi pemisahan jika dilakukan pengocokan beberapa kali hingga secara sempurna dan membentuk dua lapisan fase cair.

6.2 Optimasi Kondisi Analisis Alkaloid Total

Analisis secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dimana penelitian ini bertujuan untuk melihat ada atau tidak adanya alkaloid di dalam sampel berdasarkan nilai R_f . Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄. Permukaan silika gel ini mengandung gugus silanol dan siloksan. Sebelum digunakan lempeng KLT diaktivasi dengan oven pada suhu 110°C selama 30 menit. Aktivasi lempeng ini bertujuan untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian dan mengaktifkan gugus silanol dan siloksan dari lempeng sehingga dapat berinteraksi dengan analit (Dewi, 2018).

Standar yang digunakan pada penelitian ini adalah kafein. Standar kafein dipilih karena kafein merupakan senyawa alkaloid golongan xantin yang memiliki struktur yang sama dengan senyawa yang akan di uji (Wahyuni & Marpaung, 2020).

Dari penjelasan di atas, dilakukan optimasi pada penelitian ini, diantaranya:

6.2.1 Optimasi Penentuan Fase Gerak

Optimasi ini dilakukan untuk mendapatkan fase gerak dengan perbandingan yang tepat. Fase gerak ini terdiri dari 2 pelarut organik yang dicampur. Campuran fase gerak ini termasuk campuran sederhana karena memiliki daya elusi dari campuran kedua pelarut sehingga bisa diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Padanun & Minarsih, 2021). Optimasi ini menggunakan *chamber* yang sebelum digunakan dijenuhkan terlebih dahulu. Penjenuhan *chamber* dilakukan dengan cara meletakkan fase gerak dan meletakkan kertas saring ke dalam *chamber*. Bagian bawah dari kertas saring harus tercelup di dalam fase gerak. Kertas saring didiamkan hingga fase gerak naik membasahi kertas saring. Penjenuhan *chamber* ini bertujuan agar ruang kosong dalam *chamber* penuh dengan uap fase gerak sehingga pada saat melakukan elusi kecepatan penguapan fase gerak naik secara bersamaan (S. Fatimah *et al*, 2017). Pada saat fase gerak naik secara bersamaan maka noda pada plat klt juga akan naik secara bersamaan dan menghasilkan noda yang sejajar. Pengamatan noda yang sejajar dilakukan dengan sinar UV 254 nm. Penggunaan sinar UV 254 nm karena lempeng KLT akan memancarkan sinar sedangkan sampel akan berwarna gelap (Karima *et al*, 2019).

Hasil optimasi fase gerak pada penelitian adalah kloroform : etanol dengan perbandingan 99:1 v/v. Kloroform memiliki sifat non polar dan etanol memiliki sifat polar. Alkaloid bersifat polar sehingga pada saat dielusi dengan fase gerak non polar akan membentuk spot yang baik, yaitu nilai R_f masuk dalam rentang 0,2-0,8. Hasil nilai R_f pada penelitian ini yaitu dengan R_f rata-rata 0,321 sehingga fase gerak ini dianggap tepat untuk digunakan (Rosyada *et al*, 2019). Pada penelitian yang dilakukan oleh Ferdinan *et al* (2021) yang menggunakan sampel berbeda yaitu daun pandan, tetapi menggunakan metode yang sama didapatkan nilai R_f rata-rata 0,4, sedangkan pada sampel yang sama tetapi menggunakan metode yang berbeda yaitu menggunakan metode HPTLC didapatkan nilai R_f rata-rata 0,632 (Prasad *et al*, 2020).

6.2.2 Optimasi Penentuan Konsentrasi Larutan Standar dan Larutan Sampel

Optimasi konsentrasi larutan standar bertujuan untuk mendapatkan hasil yang dapat memperkirakan kandungan alkaloid di dalam sampel. Hasil optimasi konsentrasi yang diperoleh yaitu 5 seri konsentrasi standar kafein yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dan 3 replikasi konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 2000 ppm. Replikasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan tingkat ketelitian yang lebih optimal dan hasil yang konsisten dalam penelitian ini (Evi *et al*, 2016). 5 seri konsentrasi standar kafein sudah sesuai karena hasil luas area dari 3 replikasi sampel sudah masuk ke dalam rentang luas area standar kafein. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam sampel terdapat kadar alkaloid meskipun kadarnya sangat kecil.

Konsentrasi standar kafein pada penelitian sebelumnya menggunakan konsentrasi larutan standar yang berbeda yaitu 400, 600, 800, 1000 dan 1400 ppm (Milanda, 2021). Hal ini karena pada penelitian ini luas area yang diperoleh sampel sangat rendah sehingga perlu menurunkan konsentrasi larutan standar agar luas area dari sampel masuk dalam rentang luas area standar kafein.

Konsentrasi sampel pada penelitian sebelumnya menggunakan konsentrasi sampel yang berbeda yaitu 5000 ppm (Agustin, 2022). Pada penelitian ini menggunakan 2000 ppm karena noda sampel pada plat KLT sejajar dengan noda standar kafein.

6.2.3 Optimasi Panjang Gelombang Optimum

Optimasi panjang gelombang optimum memiliki tujuan untuk mendapatkan panjang gelombang yang menghasilkan serapan yang maksimal sehingga pengukuran yang diperoleh juga tepat (S. F. Fatimah *et al*, 2020). Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan cara membuat 5 seri konsentrasi, yaitu konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Penggunaan 5 seri konsentrasi ini memiliki tujuan untuk mengetahui bahwa semua konsentrasi pada seri baku ini menghasilkan spektrum serapan maksimum yang sama. *Scanning* panjang gelombang optimum ini dilakukan pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Senyawa yang dianalisis pada densitometer merupakan senyawa yang mempunyai gugus kromofor dan auksokrom. Kromofor merupakan gugus yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.

Auksokrom adalah gugus yang memiliki atom dengan pasangan elektron bebas (Suhartati, 2017).

Hasil penelitian ini didapatkan panjang gelombang optimum dari 5 seri konsentrasi pada panjang gelombang 275 nm yang berarti pada panjang gelombang ini menghasilkan sensitivitas pengukuran yang baik (Hanwar *et al*, 2018). Berdasarkan struktur alkaloid yang diuji, alkaloid memiliki gugus ikatan rangkap terkonjugasi sehingga penyerapan sinar UV pada Panjang gelombang 275 nm dilakukan oleh senyawa kromofor. Pada penelitian yang dilakukan sebelumnya menggunakan instrumen yang sama juga menghasil panjang gelombang 275 nm (Rahmadona *et al*, 2022).

6.3 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Penetapan kadar pada penelitian menggunakan metode KLT-Densitometri. Alasan pemilihan metode ini karena pemisahan menggunakan KLT membutuhkan waktu yang cepat dan memberikan hasil yang baik. Hal ini sesuai dengan farmakope bahwasanya KLT bisa digunakan untuk penetapan kadar salah satunya adalah kadar alkaloid (Rosamah, 2019). Selain itu, menggunakan metode KLT kadar yang ditetapkan dapat dilakukan secara langsung pada sampel suspensi atau sampel keruh, cepat, dan memungkinkan terjadi secara simultan dan metode KLT lebih mudah, dan alat yang digunakan sederhana (Savitri dan Megantara, 2019).

Pada penelitian ini menggunakan 5 seri konsentrasi standar kafein yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dan 3 replikasi konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 2000 ppm. Setelah membuat larutan standar dan larutan sampel kemudian melakukan penotolan pada lempeng KLT yang sebelumnya sudah diaktivasi.

Kemudian melakukan penotolan dengan volume 20 μL untuk larutan standar kafein dan melakukan penotolan dengan volume 100 μL untuk larutan sampel. Melakukan penotolan dengan volume 100 μL dikarenakan pada volume yang lebih kecil bercak pada lempeng KLT tidak terlihat jelas sehingga perlu menaikkan volume penotolan. Kemudian lempeng dielusi menggunakan fase gerak kloroform : etanol (99:1) v/v. Kemudian dianalisa menggunakan densitometer.

Analisa menggunakan densitometer didapatkan persamaan regresi linier pada penelitian ini yaitu $y = 0,000004x + 0,0226$ dengan nilai $R^2 = 0,9904$. Diperoleh hasil kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam 50 mg sebanyak 0,02003 mg alkaloid total. Hasil % kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 2,003 % \pm 0,001 b/b dengan nilai % RSD yang didapat pada penelitian ini yaitu 4,99 %.

Nilai % RSD menunjukkan ketelitian dari metode yang digunakan pada suatu penelitian. Jika % RSD < 1 % artinya sangat teliti, jika 1 % \leq RSD \leq 2 % artinya teliti, jika 2 % \leq RSD \leq 5 % artinya ketelitian sedang dan jika RSD > 5 % artinya tidak teliti (Sulistiyani *et al*, 2021). Pada penelitian ini didapatkan nilai % RSD sebesar 4,99 %. Hal ini berarti metode yang digunakan memiliki ketelitian sedang karena nilai % RSD berada pada rentang 2 % \leq RSD \leq 5 %. Pada penelitian sebelumnya dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLT-KT) dihasilkan nilai % RSD sebesar 0,775 % yang artinya menggunakan metode KLT-KT lebih memiliki tingkat ketelitian yang sangat tinggi. Hasil %RSD yang masih tinggi bisa disebabkan dari preparasi yang kurang tepat sehingga mempengaruhi nilai RSD dari suatu penelitian yang dilakukan (Prasad *et*

al, 2020). KLT-KT memiliki tingkat ketelitian yang tinggi daripada KLT karena perbedaan pada fase diam. Fase diam yang digunakan pada KLT-KT memiliki permukaan yang sangat halus dengan ketebalan 0,1 mm. Ukuran permukaan yang sangat halus ini menyebabkan pemisahan lebih cepat dengan hasil yang lebih akurat (Anugerah, 2023).

Pada penelitian ini menghasilkan % kadar alkaloid total sebesar 2,003 %. Hal ini sesuai rentang kadar alkaloid total biji kakao 0,8-3,7 % (Apriyanto, 2021). Hasil ini bisa direkomendasikan sebagai antibakteri karena mampu menghancurkan peptidoglikan pada bakteri sehingga sel menjadi rusak. Rekomendasi dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pohan *et al* (2020) mampu menghambat aktivitas bakteri. Pada penelitian sebelumnya dengan menggunakan metode HPLC dihasilkan % kadar alkaloid total sebesar 1,75% (Rina *et al*, 2016). Perbedaan ini terjadi kemungkinan dari penggunaan metode yang berbeda. Faktor lain dari sampel yang digunakan juga menjadi penyebab perbedaan kadar kandungan kimia pada biji kakao, diantaranya faktor ketinggian tanah dan curah hujan.

Faktor ketinggian tanah juga menjadi faktor perbedaan kadar kimia biji kakao. Syarat tumbuh yang baik pada biji kakao berada pada ketinggian 0-600 mdpl. Semakin tinggi ketinggian tanah maka kadar yang dihasilkan akan semakin rendah (Haryanto, 2020). Hal ini dapat dibuktikan dengan sampel penelitian yang peneliti lakukan menggunakan sampel yang berasal dari Puslitkoka Jember yang memiliki ketinggian tanah 45 mdpl dengan % kadar alkaloid total sebesar 2,003 %, sedangkan pada penelitian sebelumnya menggunakan sampel yang berasal dari

Kebun Percobaan Sidondo Palu yang memiliki ketinggian 85 mdpl dengan % kadar alkaloid sebesar 1,75 % (Rina *et al*, 2016).

Curah hujan yang baik untuk tanaman kakao adalah 1500-2000 mm/tahun. Tanaman kakao dalam pertumbuhannya membutuhkan sinar matahari yang tidak berlebihan, suhu tidak terlalu tinggi dan kebutuhan air yang cukup disepanjang tahun (Tjahjana *et al*, 2014). Hal ini dapat dibuktikan dengan sampel penelitian yang peneliti lakukan menggunakan sampel yang berasal dari Puslitkoka Jember yang memiliki curah hujan 2.091 mm/tahun dengan % kadar alkaloid total sebesar 2,003 %. Sedangkan pada penelitian sebelumnya menggunakan sampel yang berasal dari Kebun Percobaan Sidondo Palu yang memiliki *curah* hujan 786-900 mm/tahun dengan % kadar alkaloid sebesar 1,75 % (Rina *et al*, 2016).

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian yang sudah dilakukan, yaitu:

- 1) Fase gerak yang dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri adalah kloroform : etanol (99:1) v/v.
- 2) Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri adalah panjang gelombang 275 nm.
- 3) Konsentrasi yang digunakan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri adalah konsentrasi standar 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm dan konsentrasi sampel 2000 ppm.
- 4) Hasil kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri adalah 2,003 % b/b per 50 mg sampel.

7.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Bagi Peneliti

Penelitian selanjutnya disarankan melakukan penelitian mengenai penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KLT-Densitometri dengan kondisi optimasi yang berbeda.

- 2) Bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao

Bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao disarankan melakukan pelatihan dalam pengelolaan sampel kakao yang akan digunakan sebagai sampel penelitian.

3) Bagi Institusi Pendidikan

Bagi institusi pendidikan disarankan untuk memperbanyak literatur seperti seminar atau makalah tentang penetapan kadar biji kakao sehingga mahasiswa dapat lebih memahami tentang penetapan kadar pada biji kakao.

4) Bagi Masyarakat

Bagi masyarakat disarankan dapat mengelolah produk lain dari biji kakao serta dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan mengenai biji kakao.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdussamad, Z. 2021. *Metode Penelitian Kualitatif* (1st ed.). Syakir Media Press.
- Agustin, F. A. 2022. Skrining dan Analisis KLT-Densitometri untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total pada Fraksi Etil Asetat Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*). In *Skripsi*. Universitas dr Soebandi.
- Alasa, A. N., Anam, S., & Jamaluddin. 2017. Analisis Kadar Total Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Tamoenu (*Hibiscus surattensis* L.) [Analyze Total Level of Secondary Metabolites from Ethanol Extracts of “Tamoenu” Leaves (*Hibiscus Surattensis* L.)]. *Kovalen*, 3(3), 258–268.
- Alzanado, R., Yusuf, M., & Tutik. 2022. Analisis Kadar Senyawa Alkaloid Dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. *Farmasi Malahayari*, 5(1), 108–120. <http://librepo.stikesnas.ac.id/40/>
- Amalia, T. I., & Arsito, P. N. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Non-Polar N-Heksan Ekstrak Etanolik Daun Avokad (*Persea americana* Mill.) Terhadap *Escherichia coli*.
- 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 Comparison of Yield of Ethanol Extract, n-Hexane Fraction, Ethyl Acetate, and Water Beet Leaf (*Beta vulgaris*). 1–7.
- Anshari, H. Y. 2017. Pemberian Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menghambat Penurunan Kadar Nitric Oxide (NO) dan Jumlah Sel Endotel Korpus Kavernosa Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Wistar Diabetes. *E-JURNAL Indonesian Journal of Anti Aging Medicine*, 1(1), 32–37.
- Anugerah, W. 2023. Perbedaan TLC dan HPTLC: Mana yang Lebih Efektif dalam Analisis Kromatografi? Localstartufest.Id.
- Apriyanto, M. 2021. *Monograf: Peningkatan Mutu Biji Kakao Petani*. Nuta Media.
- Ardiyanto, M. J., & Penagsang, P. 2022. Analisis Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kinerja Koperasi (Studi Kasus : Koperasi Di Surabaya Utara). *Jurnal Ekonomi & Bisnis*, 7(1), 27–40.
- Baharum, Z., Akim, A. M., Hin, T. Y. Y., Hamid, R. A., & Kasran, R. 2016. *Theobroma cacao*: Review of the Extraction, Isolation, and Bioassay of Its Potential Anti-cancer Compounds. *Tropical Life Sciences Research*, 27(1), 21–42.
- Baskaran, G., Salvamani, S., Ahmad, S. A., Shaharuddin, N. A., Pattirama, P. D., & Shukor, M. Y. 2015. HMG-CoA reductase inhibitory activity and phytocomponent investigation of *Basella alba* leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia. 509–517.
- Budiman, H., Rahmawati, F., & Sanjaya, F. 2014. Isolasi dan Identifikasi Alkaloid pada Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta* Lindl. Ex De Will) dengan Cara Kromatografi Lapis Tipis. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi (Journal of Pharmacy Science)*, 1(1), 54–64.

- <http://ejournal.stikesmukla.ac.id/index.php/cerata/article/view/11/7>
- Christina, M., Hidayat, R. N., & Setiawan, D. 2016. *Pemisahan Rhenium-188 Dari Sasaran Wolfram-188 Dengan Metode Ekstraksi Menggunakan Pelarut Metil Etil Keton. 1*, 1–11.
- Cui, Y., Kim, S. H., Kim, H., Yeom, J., Ko, K., Park, W., & Park, S. 2012. AFM Probing the Mechanism of Synergistic Effects of the Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) with Cefotaxime against Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 7(11), 1–6.
- Depkes RI. 2014. *Farmakope Indonesia V*. Kementerian Kesehatan RI.
- Dewi, N. L. A. 2018. Pemisahan, Isolasi, dan Identifikasi Senyawa Saponin Dari Herba Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban). *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(2), 68. <https://doi.org/10.24843/jfu.2018.v07.i02.p05>
- Ekasari, Y. K. 2018. Pengaruh Biaya Pendidikan Dan Kinerja Guru Terhadap Pencapaian Siswa (Analisis Deskriptif Pada Sma Negeri Di Kabupaten Purwakarta). *Jurnal Ekonomi Dan Bisnis*, 2(1), 125–143.
- Errors, A., & Sittisaree, W. 2023. *TLC Tips & Tricks*. Merck KGaA.
- Estetika, D. 2017. Validasi Metode Analisis Metoprolol Dalam Urin Manusia Secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. *53*(9), 7–10.
- Evi, Y., Vitasari, P., & A, S. T. S. L. 2016. Pengurangan Produk Cacat Pada Bahan Baku Kulit Dengan Metode Taguchi Pada PT . Surya Sukmana Leather. *Jurnal Teknologi Dan Manajemen Industr*, 2(1), 35–39.
- Fajriana, N. H., & Fajriati, I. 2018. Analisis Kadar Kafein Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) pada Variasi Suhu Sangrai secara Spektrofotometri Ultra Violet. *Analit: Kimia Analitik Dan Lingkungan*, 3(2), 148–162.
- Farhanandi, B. W., & Indah, N. K. 2022. Karakteristik Morfologi dan Anatomi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) yang Tumbuh pada Ketinggian Berbeda. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(2), 310–325. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v11n2.p310-325>
- Fatimah, S. F., Edityaningrum, C. A., Istyqomah, W. N., Gandjar, I. G., & Nurani, L. H. 2020. Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (Klt)-Densitometri Untuk Penetapan Kadar B-Karoten Dalam Tablet Kunyah Ekstrak Spirulina platensis. *Ilmiah Ibnu Sina*, 5(2), 298–308.
- Fatimah, S., Rahayu, M., & Indari, D. F. 2017. Analisis Antalgin Dalam Jamu Pegal Linu Yang Dijual Di Pasar Beringharjo Yogyakarta. *Jurnal Kesehatan*, 4(1).
- Febryanto, M. A. 2017. Studi Ekstraksi dengan Metode Soxhletasi Pada Bahan Organik Umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) Sebagai Inhibitor Organik. In *Institut Teknologi Sepuluh Nopember*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Felicia, M., Tanudjaja, B. B., Salamoon, D. K., Studi, P., Komunikasi, D., Seni, F., Petra, U. K., & Siwalankerto, J. 2016. *Perancangan Media Komunikasi Visual Produk Cokelat Vicco Kopkar Sekar Jember Abstrak Pendahuluan Rumusan Masalah Batas Lingkup Perancangan Tujuan Perancangan Metode Pengumpulan Data Metode Analisis Data*. 1–10.
- Ferdinan, A., Rizki, F. sri, & Rahmawati, N. 2021. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Alkaloid Dalam Ekstrak Etanol Daun Pandan Hutan Jenis Baru (Freycinetia

- sessiliflora). *Komunitas Farmasi Nasional*, 1(2), 110–120.
- Hanwar, D., Aisyah, S., & Suhendi, A. 2018. Validasi Metode KLT-Densitometri untuk Penetapan Kadar Kurkumin pada Produk Obat Herbal Berbasis *Curcuma sp.* *Proceeding of The URECOL*, 379–385.
- Hartuti, S., Juanda, & Khathir, R. 2020. Upaya Peningkatan Kualitas Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) melalui Tahap Penanganan Pascapanen (Ulasan). *Balai Besar Industri Hasil Perkebunan*, 15(3), 38–52. <http://202.47.80.55/bbihp/article/view/6318>
- Haryanti, S., Larasati, R. D., & Agusta, H. 2020. *Optimasi Waktu Maserasi Dan Konsentrasi Ekstrak Gel Antiseptik Kulit*. 9(2), 17–24.
- Haryanto, F. 2020. *Panduan lengkap budidaya kakao agar berbuah lebat*. 1–4.
- Hujjatusnaini, N., Ardiansyah, Indah, B., Afritri, E., & Widyastuti, R. (2021). *Ekstraksi*.
- Javelot, H., Messaoudi, M., Jacquelin, C., Violle, N., Bisson, J.-F., Nejd, A., Rozan, P., & Desor, D. 2009. Antidepressant-like properties of cocoa's polyphenols The role of flavanoids and flavanols on depression. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 20, 19–21.
- Julianto, T. S. 2019. *Fitokimia (Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia)*.
- Kapondo, G. L., Fatimawali, & Jayanti, M. 2020. Isolasi , Identifikasi Senyawa Alkaloid Dan Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L .*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal EBiomedik*, 8(2), 180–186.
- Karim, S. F. 2014. *Uji Aktivitas Infusa Daun Srikaya (Annona squamosa L.) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Dalam Darah Mencit (Mus musculus)*.
- Karima, N., Pratiwi, L., & Apridamayanti, P. 2019. *Identifikasi Senyawa Kuersetin Ekstra Etil Asetat Daun Senggani (Melastoma malabathricum L.) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)*. 4, 1–6.
- Kemendikbud. 2018. Buku Informasi Melaksanakan Analisa Secara Kromatografi Konvensional Mengikuti Prosedur. *Kemendikbud*, 9, 80.
- Kemenkes RI. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi 3*. <https://doi.org/10.1201/b12934-13>
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2015. Petunjuk Teknis Pemetaan Sebaran Jenis Agen Hayati Yang Dilindungi, Dilarang, dan Invasif di Indonesia. In *Jurnal Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan* (pp. 1–34).
- Kementerian Kesehatan RI. 2020. *Farmakope Indonesia Edisi VI*.
- Klau, M. H. C., & Hesturini, R. J. 2021. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans (Burm F) Lindau*) Terhadap Daya Analgetik Dan Gambaran Makroskopis Lambung Mencit. *Jurnal Farmasi & Sains Indonesia*, 4(1), 6–12.
- Kristariyanto, Y. A., Yuhara, N. A., & Rawar, E. A. 2022. Penentuan Kadar Alkaloid Total Dan Fenolik Total Dalam Ekstrak Etanol Umbi Rumpuk Teki (*Cyperus Rotundus L.*). *Duta Pharma Journal*, 2(1), 45–48.
- Kumalasari, D. C., & Suswati, E. 2015. *Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*

- Theobroma cacao*) sebagai Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*. 3(1), 29–33.
- Kurniawan, B., & Aryana, W. F. 2015. Binahong (*Cassia Alata* L) As Inhibitor Of *Escherichia Coli* Growth. *J Majority*, 4(4), 100–104.
- Kurniawati, I., Maftuch, & Hariati, A. M. 2016. Penentuan Pelarut Dan Lama Ekstraksi Terbaik Pada Teknik Maserasi *Gracilaria sp.* Serta Pengaruhnya Terhadap Kadar Air Dan Rendemen. 7(2), 72–77.
- Laboko, A., & Nurhafisah. 2020. Mutu Komponen Aktif Minuman Instan Kakao dengan Penambahan *Curcuma Xanthorrhiza* Roxb. In *Suparyanto dan Rosad (2015)* (Vol. 5, Issue 3).
- Laily, S. 2016. Analisis Kafein Pada Daun Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Dan Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. In *Syarifatul Laily* (Vol. 96).
- Marfuah, Pratiwi, L., & Apridamayanti, P. 2019. Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Kloroform Buah Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–8.
- Martono, B. 2014. Karakteristik Morfologi Dan Kegiatan Plasma Nutfah Tanaman Kakao. *Inovasi Teknologi Bioindustri Kakao*, 15–28.
- Maulana, M. 2018. Profil Kromatografi Lapis Tipis (Klt) Ekstrak Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina Cristi*. L) Berdasarkan Variasi Pelarut. In *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mauliyanti, R. 2017. Uji Aktivitas Gel Ekstrak Etanol Daun Cempedak (*Arthocarpus champeden*) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat.
- Milanda, R. D. 2021. Analisis Dan Penetapan Kadar Kafein Dengan Ekstrak Metanol Pada Sampel Teh Hitam Dari Ptpn Xii Lawang Jawa Timur Menggunakan Klt- Densitometri. Universitas dr Soebandi.
- Mulato, S. 2022. "Ionic Nano Copper" Antimikroba Sabun Cuci Tangan Berbasis Senyawa Kalium Kulit Buah Kakao. Cctcid.Com. <https://www.cctcid.com/2020/05/01/inonic-nano-cooper-antimikroba-sabun-cuci-tangan-cair-berbasis-senyawa-kalium-kulit-buah-kakao/#respond>
- Ningsih, D. R., Zufahair, & Kartika, D. 2016. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak Sebagai Antibakteri. 11(1), 101–111.
- Ningsih, W., Kamaludin, M., & Alfian, R. 2021. Hubungan Media Pembelajaran dengan Peningkatan Motivasi Belajar Siswa Pada Mata Pelajaran PAI di SMP Iptek Sengkol Tangerang Selatan. *Jurnal Tarbawi*, 06(01), 77–92.
- Nora, A., & Seprianto. 2017. Bioteknologi Bahan Alam. Modul . *Bioteknologi. Universitas Esa Unggul*, Ibt 452, 1–85.
- Novia. 2021. Nyesel Banget Baru Tahu! Buah Kakao Ternyata Bisa Menjadi Obat Alami Pereda Depresi dan Memperbaiki Suasana Hati, Caranya pun Simple Banget. Grid..Id. <https://www.grid.id/read/042857510/nyesel-banget-baru-tahu-buah-kakao-ternyata-bisa-menjadi-obat-alami-pereda-depresi-dan-memperbaiki-suasana-hati-caranya-pun-simple-banget?page=all>
- Nudiasari, V., Suhariyadi, & Istanto, W. 2019. Efektivitas Ekstraksi Antara Maserasi Dengan Digesti Terhadap Kadar Flavonoid Buah Naga Putih

- (*Hylocereus undatus*). 8(1), 677–682.
- Nuraskin, C. A., Reza, & Salfiyadi, T. 2022. Identifikasi Ekstrak Metanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Bahan Dasar Pasta Gigi. *Mutiara Kesehatan Masyarakat*, 7(2), 67–73.
- Nurhasnawati, H., Handayani, F., & Samarinda, A. F. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 3(1), 91–95.
- Okzelia, S. D., Hendrati, D., & Ilias, N. 2017. Isolasi Dan Pemisahan Senyawa Alkaloid Dari Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl.) Dengan Metode Kromatografi Cair. *Nursing and Health*, 1(2), 80–85.
- Padanun, M. A. V., & Minarsih, T. 2021. Analisis Natrium Diklofenak Dalam Sampel Jamu Pegal Linu Yang Dijual Di Kabupaten Semarang Secara Klt-Spektrofotometri Uv-Vis. *Holistics and Health Sciences*, 3(2), 163–176.
- Pamungkas, K., & Murruckmihadi, M. 2015. Isolation and Determination of *Hibiscus rosa-sinensis* L. Flowers Ethanolic Extract using Spectrodensitometry. *Traditional Medicine Journal*, 20(2), 2015.
- Pohan, D. J., Kakerissa, A. P., & Arodes, E. S. 2020. Uji Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Antibakteri Dalam Berbagai Konsentrasi pada *Streptococcus Pyogenes*. *Majalah Kedokteran*, XXXVI(1), 8–13.
- Prasad, S., Kalpana, D., Priyanka, G., Mounika, K., Sucharitha, K., Supriya, K., & Rao, R. 2020. *Estimation Of Caffeine Content In Chocolates By Using HPTLC*. 10(07).
- Pratiwi S.P., J. M. 2022. Validasi Metode Analisis Spektrofotometri Uv- Vis Dan Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). In *Skripsi*. Universitas dr Soebandi.
- Purwaningsih, E. 2014. Pemendekan Telomer Dan Apoptosis Telomere Shorthening And Apoptosis. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 22(2), 132–141.
- Putra, I. B. G. A. R. E., Laksmi, N. P. L., & Widjaja, I. N. K. 2015. Optimasi Metode Ekstraksi Cair-Cair Senyawa-Senyawa Pada Tablet Ekstasi Ditentukan Dengan Spektrofotodensitometer. *Indonesian Journal of Legal and Firensic*, 4–10.
- Putri, F. E., Diharmi, A., & Karnila, R. 2023. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Pada Rumpun Laut Coklat (*Sargassum plagyophyllum*) Dengan Metode Fraksinasi. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia*, 15(1), 40–46. <https://doi.org/10.17969/jtipi.v15i1.23318>
- Rahmadona, S. P., Marzuki, H., & Darhani, C. R. 2022. Identifikasi Kafein Dalam Jamu Penambah Stamina Pria Sediaan Padat Secara Klt-Densitometri. *Prosiding Seminar Nasional Sains Dan Teknologi Terapan*, 5, 449–458. <http://semnas.radenfatah.ac.id/index.php/semnasfst/article/view/312%0Ahttp://semnas.radenfatah.ac.id/index.php/semnasfst/article/download/312/261>
- Rahmi, N., Salim, R., Miyono, M., & Rizki, M. I. 2021. Pengaruh Jenis Pelarut Dan Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antibakteri Dan Penghambatan Radikal Bebas Ekstrak Kulit Kayu Bangkal (*Nauclea subdita*). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 39(1), 13–26.

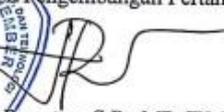
- Rina, P., Dewi, F. S., Ellyza, H., & Zainal, A. M. rsquo ud. 2016. Identification of alkaloids of Indonesian Cacao beans (*Theobroma cacao* L.) and its effect on tooth enamel hardness. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(15), 202–208. <https://doi.org/10.5897/jmpr2016.6052>
- Rosamah, E. 2019. *Kromatografi Lapis Tipis Metode sederhana dalam Analisis Kimis Tumbuhan Berkayu*.
- Rosyada, E., Muliastari, H., & Yuanita, E. 2019. Analisis kandungan bahan kimia obat Natrium Diklofenak dalam jamu pegal linu yang dijual di Kota Mataram. *Ilmiah Farmasi*, 15(1), 12–19.
- Rusdi, M., & Hasan, T. 2018. Perbandingan Metode Ekstraksi terhadap Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Batang *Boehmeria virgata* Comparison of Extraction Methods on Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of *Boehmeria virgata* Stem. *Ad-Dawaa' Jour.Pharm.Sci.*, 1(1), 16–24.
- Sabiladiyini, H. A., Trianto, A., & Djunaedi, A. 2018. Uji Pendahuluan Aktivitas Produk Biotransformasi Daun *Mangrove Avicennia marina* Dengan Isolat Jamur Terhadap Bakteri Patogen *Klebsiella pneumonia* dan *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Marine Research*, 7(4), 273–282.
- Salamah, N., Rozak, M., & Al Abror, M. 2017. Pengaruh metode penyarian terhadap kadar alkaloid total daun jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa*. BL) dengan metode spektrofotometri visibel. *Pharmaciana*, 7(1), 113.
- Sari, A. P. 2019. *Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Kandungan Bahan Kimia Berbahaya pada Krim Pemutih Wajah dari 4 Klinik Kecantikan Ternama di Kota Yogyakarta*. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Sari, Y., Syahrul, & Iriani, D. 2020. Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia. *Jurusan Teknologi Hasil Pertanian*, 12(02), 10–16.
- Savitri, A., & Megantara, S. 2019. Metode Klt-Densitometri Sebagai Penetapan Kadar Bahan Aktif Sediaan Farmasi. *Jurnal Farmaka*, 17(2), 455–463.
- Senduk, T. W., Montolalu, L. A. D. Y., & Dotulong, V. 2020. Rendemen Ekstrak Air Rebusan Daun Tua Mangrove (*Sonneratia alba*). *Perikanan Dan Kelautan Tropis*, 11(1), 9–16.
- Sganzerla, M., Coutinho, J. P., de Melo, A. M. T., & Godoy, H. T. 2014. Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 64, 718–725.
- Smith, D. F. 2013. Benefits of flavanol-rich cocoa-derived products for mental well-being: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.09.002>
- Stanley, A. 2018. *Validasi Metode Thin-Layer Chromatography (Tlc) - Densitometri Pada Penetapan Kadar Kafein Dalam Validasi Metode Thin-Layer Chromatography (Tlc) -Densitometri Pada Penetapan Kadar*. 83.
- Sudarwati, T. P. L., & Fernanda, M. A. H. F. 2019. *Aplikasi Pemanfaatan Daun Pepaya (Carica papaya) sebagai Biolarvasida terhadap Larva Aedes aegypti (Pertama)*. Graniti. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-dasar Spektrofotometri Uv-Vis san Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. CV. Anugrah Utama Raharja.

- Sulistiyani, M., Kusumastuti, E., Huda, N., & Mukhayani, F. 2021. Method Validation on Functional Groups Analysis of Geopolymer with Polyvinyl Chloride (PVC) as Additive Using Fourier Transform Infrared (FT-IR). *Indonesian Journal of Chemical Science*, 10(3), 198–205.
- Susilo, A. W., Nugroho, D., Sari, I. A., & Hartatri, D. F. S. 2019. Katalog Produk dan Jasa Unggulan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. In *Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*.
- Suwandi, T. 2012. *Universitas indonesia pengembangan potensi antibakteri kelopak bunga*. Universitas Indonesia.
- Tjahjana, E. B., Supriadi, H., & Rokhmah, D. N. 2014. The Effect of Environment on Production and Quality of Cocoa. *Bunga Rampai : Inovasi Teknologi Bioindustri Kakao*, 69–78.
- Tunjung-sari, A. B., Suswati, E., Mufida, D. C., & Setiawan, A. R. 2016. *Study on Activity of Cocoa Ethanolic Extract Against Shigella dysenteriae*. 32(2), 130–137.
- Wahab, M. F., Indahsari, Y., Nurdiana, Maggabarani, A. M., & Nur, P. B. A. 2020. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan Metode Difusi Cakram. *Indonesia Journal Of Fundamental Sciences*, 6(1), 8–15.
- Wahyuni, S., & Marpaung, M. P. 2020. Penentuan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca Miers*) Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Etanol Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Pendidikan Kimia Dan Ilmu Kimia*, 3(November), 52–61.
- Wall, P. E. 2005. *Thin-layer Chromatography A Modern Practical Approach*. The Royal Society of Chemistry.
- Wardani, A. D. 2021. *penyusunan skripsi dengan judul “Validasi Metode Dan Penentuan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (Annona muricata L.). Secara Spektrofotometri UV- Vis Di Desa Kemiri Kabupaten Jember*.
- Wathan, N., Firdaus, A. R., & Arishandi, S. 2020. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Kadar Flavonoid Daun Kareho (*Callicarpa longifolia Lam*). *Jurnal Pharma Xplore*, 5(1), 23–33.
- Wendersteyt, N. V., Wewengkang, D. S., & Abdullah, S. S. 2021. Uji Aktivitas Antimikroba Dari Ekstrak dan Fraksi *Ascidian Herdmania momus* Dari Perairan Pulau Bangka Likupang Terhadap Pertumbuhan Mikroba *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *Candida albicans*. *Pharmacon*, 10(1), 706.
- Wulandari, L. 2011. Kromatografi Lapis Tipis. In *Taman Kampus Presindo*.
- Yassir, M., & Asnah, A. 2019. Pemanfaatan Jenis Tumbuhan Obat Tradisional Di Desa Batu Hampan Kabupaten Aceh Tenggara. *Biotik: Jurnal Ilmiah Biologi Teknologi Dan Kependidikan*, 6(1), 17–35.
- Zahar, N. A., Hanun, N. Z., Yulistiani, F., & Heriyanto. 2021. Studi Literatur Implementasi Metode Microwave Assisted Extraction (MAE) untuk Ekstraksi Fenol dengan Pelarut Etanol. *Fluida*, 14(2), 80–87. <https://doi.org/10.35313/fluida.v14i2.2542>
- Zulkifli, F., Agustini, S. M., Annisa, & Hasanah. 2016. *Pengaruh Ekstrak Biji*

Cokelat (Theobroma cacao L) Terhadap Kadar Malondialdehid (Mda) Tikus Putih Jantan (Rattus Norvegicus Strain Wistar) Dengan Induksi Hiperkolesterol. 12(1), 7–12.

LAMPIRAN

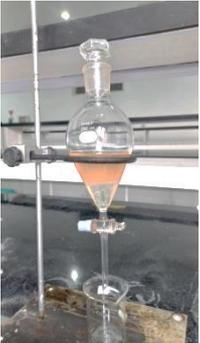
Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064 Revisi : 0
 <p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI POLITEKNIK NEGERI JEMBER UPA. 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</p>
<hr/> <u>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN</u> No: 54/PL17.8/PG/2023
<p>Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 1195/FIKES.UDS/U/III/2023 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:</p>
<p>Nama : Roudatul Jannah NIM : 19040119 Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi</p>
<p>maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah: <i>Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L</i></p>
<p>Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.</p>
<p>Jember, 20 Maret 2023 Ka. UPA Pengembangan Pertanian Terpadu  UPT. R. Prasad R. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM NIP. 197106212001121001</p>

Lampiran 2. Sertifikat Kafein

		3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA Website: www.sigma-aldrich.com Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com	
Certificate of Analysis			
Product Name :	Caffeine powder, ReagentPlus®		
Product Number :	C0750-VAR		
Batch Number :	0000181333		
Source Batch :	0000179446		
CAS Number :	58-08-2		
Molecular Formula :	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂		
Formula Weight :	194.19		
Recommended Retest Date :	May 2026		
Quality Release Date :	20 Jun 2022		
Test	Specification	Result	
Appearance (Color)	White	White	
Appearance (Form)	Powder	Powder	
Solubility (Color)	Colorless	Colorless	
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear	
50 mg/mL, CHCl ₃			
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms	
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.5 %	0.3 %	
Initial Melting Point	≥ 233 deg	233 deg	
Final Melting Point	≤ 238.0 deg	237.0 deg	
Purity (HPLC)	≥ 99.0 %	100.0 %	
Recommended Retest Period	-----	-----	
4 years			
			
Pramod Kadam(PhD),Manager Analytical Bangalore IN			
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchase must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of website or packing slip for additional terms and conditions of sale			
Version Number: 01 Doc: 1084343		Page 1 of 1	
The branding on the header and/or footer of this document may temporarily not visually match the product purchased as we transition our branding. However, all of the information in this document regarding the product remains unchanged and matches the product ordered. For further information please contact misbranding@sial.com			

Lampiran 3. Persiapan Sampel dan Proses Ekstraksi

Gambar	Keterangan
	Simplisia biji kakao yang sudah siap pakai
	Proses ekstraksi maserasi
	Hasil ekstrak kental setelah proses ekstraksi maserasi
	Proses ekstraksi cair-cair

	<p>Hasil larutan sampel setelah proses ekstraksi cair-cair</p>
---	--

Lampiran 4. Perhitungan Ekstraksi Maserasi

Hasil Ekstrak Kering	Hasil Penimbangan
Berat serbuk simplisia	500 gram
Berat vial kosong	15,41 gram
Berat vial + ekstrak kental	49,96 gram
Berat ekstrak kental	34,55 gram
% Rendemen	6,91 %

Lampiran 5. Perhitungan Fraksinasi

Massa Ekstrak Kental	Massa Fraksi	Rendemen
50 mg	2,7 mg	5,4 %

Lampiran 6. Penelitian Menggunakan Instrumen KLT-Densitometri

Gambar	Keterangan
	<p>Larutan Stok dan Pengenceran</p>
	<p>Larutan sampel</p>



Fase gerak sebanyak 10 mL dengan perbandingan 9,9 mL kloroform dan 0,1 mL etanol



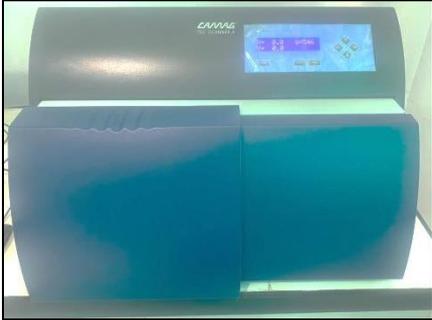
Penjenuhan *chamber*



Aktivasi lempeng



Lempeng dielusi di dalam *Chamber*

	<p>Lempeng dilihat pada sinar UV 254</p>
	<p>Lempeng dianalisis menggunakan densitometer</p>

Lampiran 7. Nilai Luas Area, Nilai R_f , dan Nilai Korelasi

Vial	Luas Area	R_f	Korelasi
Standar 1 (200 ppm)	0,02977	0.319	0.997766
Standar 2 (400 ppm)	0,03978	0.326	0.997766
Standar 3 (600 ppm)	0,04548	0.328	0.998540
Standar 4 (800 ppm)	0,05585	0.330	0.999541
Standar 5 (1000 ppm)	0,06145	0.333	0.999923
Replikasi 1 (2000 ppm)	0.03951	0.335	0.998492
Replikasi 2 (2000 ppm)	0.03713	0.300	0.998177
Replikasi 3 (2000 ppm)	0.03233	0.297	0.997952

Lampiran 8. Perhitungan Konsentrasi Larutan Stok, Pengenceran Larutan Stok, Larutan Sampel, dan Persamaan Regresi Linier

1) Larutan Stok

$$\frac{50 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 2000 \text{ ppm}$$

2) Pengenceran Larutan Stok

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

$$(1) 200 \text{ ppm} \rightarrow V_1 \times 2000 \text{ ppm} = 5 \text{ mL} \times 200 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

$$(2) 400 \text{ ppm} \rightarrow V_1 \times 2000 \text{ ppm} = 5 \text{ mL} \times 400 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

$$(3) 600 \text{ ppm} \rightarrow V_1 \times 2000 \text{ ppm} = 5 \text{ mL} \times 600 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ mL}$$

$$(4) 800 \text{ ppm} \rightarrow V_1 \times 2000 \text{ ppm} = 5 \text{ mL} \times 800 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

$$(5) 1000 \text{ ppm} \rightarrow V_1 \times 2000 \text{ ppm} = 5 \text{ mL} \times 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

3) Larutan Sampel

$$(1) \frac{50 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 2000 \text{ ppm}$$

$$(2) \frac{50 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 2000 \text{ ppm}$$

$$(3) \frac{50 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 2000 \text{ ppm}$$

4) Persamaan Regresi Linier

$$a = 0,0226$$

$$b = 0,000004$$

$$R^2 = 0,9904$$

$$y = bx + a \rightarrow y = 0,000004x + 0,0226$$

Lampiran 9. Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

1) Sampel Replikasi 1

$$y_1 = 0,03939$$

$$y = 0,000004x + 0,0226$$

$$0,03939 = 0,000004x + 0,0226$$

$$x = \frac{0,03939 - 0,0226}{0,000004}$$

$$= 4.197,5 \text{ ng}$$

$$= 0,0041975 \text{ mg}$$

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 100 μL (0,1 mL)

$$= \frac{0,0041975 \text{ mg}}{0,1 \text{ mL}}$$

$$= 0,041975 \text{ mg/mL}$$

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

$$= 0,041975 \text{ mg/mL} \times 25 \text{ mL}$$

$$= 1,049 \text{ mg}$$

- Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$= \frac{1,049 \text{ mg}}{50 \text{ mg}}$$

$$= 0,02098 \text{ mg}$$

- % Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{1,049 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 100 \%$$

$$= 2,098 \% \text{ b/b}$$

2) Sampel Replikasi 2

$$y_1 = 0,03851$$

$$y = 0,000004x + 0,0226$$

$$0,03851 = 0,000004x + 0,0226$$

$$x = \frac{0,03951 - 0,0226}{0,000004}$$

$$= 3.977,5 \text{ ng}$$

$$= 0,0039775 \text{ mg}$$

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 100 μL (0,1 mL)

$$= \frac{0,0039775 \text{ mg}}{0,1 \text{ mL}}$$

$$= 0,039775 \text{ mg/mL}$$

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

$$= 0,039775 \text{ mg/mL} \times 25 \text{ mL}$$

$$= 0,994 \text{ mg}$$

- Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$= \frac{0,994 \text{ mg}}{50 \text{ mg}}$$

$$= 0,01988 \text{ mg}$$

- % Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,994 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 100 \%$$

$$= 1,988 \% \text{ b/b}$$

3) Sampel Replikasi 3

$$y_1 = 0,03799$$

$$y = 0,000004x + 0,0226$$

$$0,03799 = 0,000004x + 0,0226$$

$$x = \frac{0,03799 - 0,0226}{0,000004}$$

$$= 3.847,5 \text{ ng}$$

$$= 0,0038475 \text{ mg}$$

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 100 μL (0,1 mL)

$$= \frac{0,0038475 \text{ mg}}{0,1 \text{ mL}}$$

$$= 0,038475 \text{ mg/mL}$$

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

$$= 0,038475 \text{ mg/mL} \times 25 \text{ mL}$$

$$= 0,961875 \text{ mg}$$

- Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$= \frac{0,962 \text{ mg}}{50 \text{ mg}}$$

$$= 0,01924 \text{ mg}$$

- % Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,962 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 100 \%$$

$$= 1,924 \% \text{ b/b}$$

$$\text{➤ Rata-rata kadar alkaloid total} = \frac{0,02098 \text{ mg} + 0,01988 \text{ mg} + 0,01924 \text{ mg}}{3}$$

$$= 0,02003 \text{ mg}$$

$$\text{➤ Rata-rata \% kadar alkaloid total} = \frac{2,098 \% + 1,988 \% + 1,924 \%}{3}$$

$$= 2,003 \% \text{ b/b}$$

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{(0,02098 - 0,02003)^2 + (0,01988 - 0,02003)^2 + (0,01924 - 0,02003)^2}{3-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{9,03 \times 10^{-7} + 2,25 \times 10^{-8} + 6,24 \times 10^{-7}}{2}}$$

$$= \sqrt{\frac{0,000002}{2}}$$

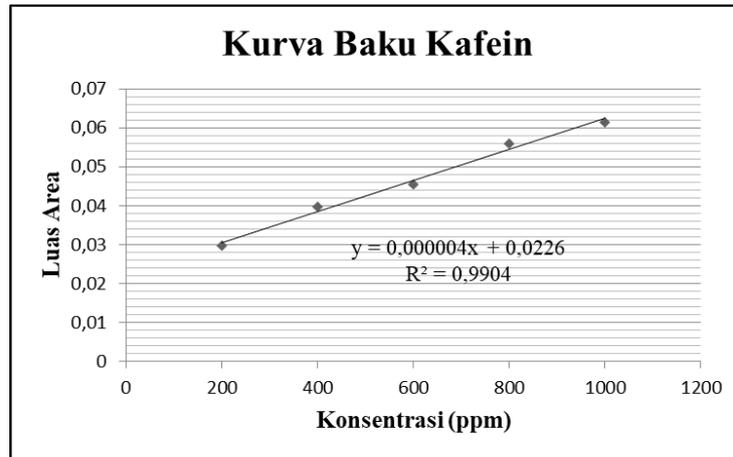
$$= \sqrt{0,000001}$$

$$= 0,001$$

$$\text{RSD} = \frac{0,001}{0,02003} \times 100 \%$$

$$= 4,99 \%$$

Lampiran 10. Kurva Baku Kafein



Lampiran 11. Panjang Gelombang Optimum Kafein 275 nm

