

## Penentuan Jenis Senyawa Flavonoid pada Isolat Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam Fraksi *n*-butanol dengan Aktivitas Antioksidan Tertinggi menggunakan Metode Spektrofotometri UV-VIS

I Made Wisnu Wardana\*, Dewa Ayu Ika Pramitha, Agung Ari Chandra Wibawa, Ni Made Sukma Sanjiwani

Fakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jl. Kamboja No. 11 A, Dangin Puri Kangin, Denpasar (80233), Indonesia

\*Penulis korespondensi: [ika.pramitha@unmas.ac.id](mailto:ika.pramitha@unmas.ac.id)

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v12.n2.48577>

**Abstrak:** Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan flavonoid yang sangat tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis senyawa flavonoid pada isolat biji kakao dalam fraksi *n*-butanol yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Sementara itu, pengujian penentuan jenis golongan senyawa flavonoid dilakukan secara kualitatif melalui metode pereaksi geser (NaOH 2M, NaOAc, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, dan HCl). Penentuan aktivitas antioksidan dilihat dari nilai AAI. Isolat 1 memperlihatkan nilai AAI sebesar 4,30±0,43 (sangat kuat), isolat 2 sebesar 3,75±0,23 (sangat kuat), isolat 3 sebesar 3,04±0,36 (sangat kuat) dan isolat 4 sebesar 1,35±0,05 (kuat). Hasil penentuan jenis flavonoid menggunakan pereaksi geser diperoleh hasil bahwa isolat 1 merupakan senyawa golongan flavanon atau dihidroflavonol dengan jenis 6,7-dihidroksi flavanon/ dihidroksi dihidroflavonol atau 7,8-dihidroksi flavanon/dihidroksi dihidroflavonol yang terdapat orto dihidroksi pada cincin A dan B.

**Kata kunci:** DPPH, flavonoid, isolat, kakao, spektrofotometri UV-Vis

**Abstract:** Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a plant that has a very high flavonoid content. This study aims to determine the type of flavonoid compounds in cocoa bean isolates in the *n*-butanol fraction that have the highest antioxidant activity. Testing of antioxidant activity is carried out by the DPPH method. Meanwhile, testing to determine the type of flavonoid compound class is carried out qualitatively through the shear reagent method (NaOH 2M, NaOAc, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, and HCl). Determination of antioxidant activity seen from the AAI value. Isolate 1 showed AAI values of 4.30±0.43 (very strong), isolate 2 of 3.75±0.23 (very strong), isolate 3 of 3.04±0.36 (very strong) and isolate 4 of 1.35±0.05 (strong). The results of determining the type of flavonoid using a shear reagent obtained the result that isolate 1 is a flavanone or dihydroflavonol group compound with a type of 6,7-dihydroxy flavanone/dihydroxy dihydroflavonol or 7,8-dihydroxy flavanone/dihydroxy dihydroflavonol which contains ortho dihydroxy in rings A and B.

**Keywords:** DPPH, flavonoids, isolate, cocoa, UV-Vis Spectrophotometry

### PENDAHULUAN

Tumbuhan dapat menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur molekul dan aktivitas biologi yang beraneka ragam serta memiliki potensi yang sangat baik untuk dikembangkan menjadi obat dalam mengatasi berbagai macam penyakit (Titis dkk. 2013). Salah satu senyawa aktif yang dimiliki oleh tumbuhan obat adalah Flavonoid. Flavonoid merupakan antioksidan eksogen yang telah terbukti bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel dan memperbaiki kerusakan sel akibat stres oksidatif (Zaetun dkk. 2017). Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung bekerja dengan cara menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui reaksi dengan senyawa reaktif radikal, karena reaktifitas

gugus hidroksil pada flavonoid yang tinggi. Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung bekerja dengan cara meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen (Layal dkk. 2017).

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa polifenol yaitu golongan flavonoid diantaranya ±58% proanthocyanidin, ±37% flavan-3-ol/flavanol, ±4% antosianidin dan ±1% flavonol glikosida (Indiarto dkk. 2019). Senyawa flavonoid dari biji kakao memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, hipokolesterolemik dan kemampuan vasodilatori. Kemampuan antioksidan pada biji kakao yang mengandung senyawa flavonoid dapat meredam radikal bebas yaitu dengan cara mendonorkan

elektron ke radikal bebas, sehingga merubah senyawa radikal menjadi non radikal (Banjarnahor & Artanti 2014).

Dalam pengujian aktivitas antioksidan pada suatu sampel digunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*). Prinsip pengujian metode DPPH adalah senyawa antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya pada radikal DPPH, sehingga menyebabkan DPPH menjadi bentuk tereduksi yang bersifat nonradikal menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm. Perubahan warna tersebut disebabkan karena berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH karena adanya penangkapan satu elektron oleh zat antiradikal yang menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi (Riskiana & Vifta 2021).

Pengujian terhadap senyawa flavonoid yang terkandung dalam suatu sampel dapat dilakukan dengan berbagai metode. Salah satu metode yang dapat digunakan dalam pengujian senyawa flavonoid adalah metode spektrofotometri UV-Vis. Flavonoid memiliki sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis. Flavonoid yang bersifat polar dapat menyerap gelombang radiasi pada daerah UV-Vis. Flavonoid terdiri dari beberapa golongan yang tiap golongan hanya berbeda pada jenis molekul pada cabang dari atom C3. Oleh karena itu, pengujian secara kualitatif flavonoid dapat dilakukan dengan metode KLT preparatif menggunakan fase diam polar dan spektrofotometer UV-Vis (Winahyu dkk. 2019)

Berdasarkan latar belakang di atas, telah dilakukan penelitian terkait penentuan aktivitas antioksidan dan jenis senyawa flavonoid pada isolat biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dalam fraksi *n*-butanol menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kakao diperoleh dari Desa Gumbrih, Kecamatan Pekutatan, Kabupaten Jembrana, Provinsi Bali pada tahun 2023 yang telah dilakukan determinasi di Laboratorium Karakterisasi Kebun Raya "Eka Karya" Bali – BRIN (Badan Riset dan Inovasi Nasional) yang berlokasi di Desa Candikuning, Kec. Baturiti, Kab. Tabanan, Bali 82191. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, etanol 96% (Brataco), *n*-heksana teknis (Brataco), etil asetat teknis (Brataco), *n*-butanol (Merck), serbuk Mg (Merck), HCL 37% (Merck), amil alkohol (Merck), *n*-butanol teknis (Brataco), asam asetat glasial teknis 98% (Alliance Chemical), serbuk DPPH (Smartlab), serbuk H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> anhidrat (Merck), NaOH (Brataco), HCl pekat (Brataco), serbuk NaOAc AR anhidrat (Merck),

serbuk AlCl<sub>3</sub> (Merck), silika gel 60 (Merck). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital (AciS BC-6000®), *Waterbath*, kompor, *beaker glass* (Pyrex®), cawan porselen (Pyrex®), batang pengaduk (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®), pipet volume (Pyrex®), labu ukur (Pyrex®), gelas ukur (Pyrex®), corong kaca (Pyrex®), corong pisah Pyrex®, *ball filler*, spatula, pipet tetes, kain flanel, *tissue*, kertas saring, *aluminium foil*, *blender*, alat-alat gelas umum yang ada di Laboratorium Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar. Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rotary Evaporator* (Buchi/Rotavapor R-11®), dan Spektrofotometer UV-Vis *double beam* (Shimadzu/UV-1800®).

### Ekstraksi

Pembuatan ekstrak etanol biji kakao dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 1200 g simplisia dimasukkan ke dalam botol kaca ditambahkan etanol 96% sebanyak 6000 mL (perbandingan 1:5), kemudian direndam selama 24 jam dengan kondisi tertutup rapat pada suhu ruang (28-29°C). Lalu diaduk tiap 6 jam selama 5 menit, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan residu dan filtrat. Residu dimaserasi kembali sebanyak 2 kali hingga pelarut tidak berwarna. Filtrat yang dihasilkan kemudian dikumpulkan untuk dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C, tekanan 110 mBar dan kecepatan 40 rpm sehingga diperoleh hasil berupa ekstrak kental (Pratyaksa dkk. 2020).

### Fraksinasi

Pembuatan fraksi dari ekstrak etanol biji kakao dilakukan dengan metode fraksinasi cair-cair menggunakan corong pisah. Sebanyak 12,5 g ekstrak kental biji kakao dilarutkan dalam 150 mL aquadest. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dengan kran tertutup. Sebanyak 50 mL *n*-heksana ditambahkan ke dalam larutan ekstrak dan dikocok hingga homogen. Fraksi *n*-heksana dipisahkan dari fraksi air dengan membuka kran corong pisah dan ditampung dalam erlenmeyer. Perlakuan diulang sebanyak 2 kali dengan pelarut yang sama. Fraksi sisa air dari *n*-heksana ditambahkan etil asetat sebanyak 50 mL. Proses yang sama dilakukan terhadap pelarut *n*-butanol sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol. Pada penelitian ini hanya digunakan fraksi *n*-butanol untuk dilanjutkan pada tahapan selanjutnya. Fraksi *n*-butanol tersebut diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C, tekanan 110 mBar dan kecepatan 40 rpm.

### Isolasi senyawa flavonoid pada fraksi *n*-butanol biji kakao

*Pemisahan senyawa menggunakan metode kromatografi lapis tipis*

Sebelum dilakukan uji kromatografi lapis tipis dilakukan penjuanan bejana terlebih dahulu. Pada tahapan pemisahan ini digunakan fase gerak *n*-butanol: asam asetat:air (3:1:1) sebanyak 10 mL. Selanjutnya dimasukan kertas saring yang telah dipotong ke dalam bejana yang berisi fase gerak, dan didiamkan sampai fase gerak jenuh. Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan melarutkan 5 mg fraksi *n*-butanol biji kakao ke dalam 5 mL etanol. Dilakukan aktivasi plat silika GF254 dengan cara dipanaskan di oven  $\pm 30$  menit pada suhu 110°C. Sampel ditotolkan pada plat silika dengan menggunakan pipa kapiler dan dimasukan dalam bejana yang telah jenuh, kemudian didiamkan hingga eluen sampai tanda batas yang telah ditentukan. Setelah itu, plat silika dikeluarkan dan diangin-anginkan sampai kering, kemudian dilakukan penyinaran pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya disemprotkan  $\text{AlCl}_3$  5% sebagai penampak bercak lalu diamati dengan melihat noda yang ada pada lempeng kemudian ditentukan nilai  $R_f$  (Oktapiya dkk. 2022).

*Pemisahan senyawa menggunakan metode kromatografi kolom*

Persiapan kromatografi kolom adalah mengaktifkan silika gel 60 (0.063-0.200 mm) sebanyak 45 g dengan cara memanaskan dalam oven pada suhu 110 °C selama 60 menit kemudian dilarutkan dengan eluen hingga terbentuk seperti bubuk (*slurry*). Pengisian kolom sebagai bahan pengisi bagian bawah kolom dimasukkan wol kaca, kemudian bubuk silika gel dimasukkan melalui dinding kolom secara perlahan sambil diaduk agar tidak terdapat rongga udara di tengah-tengah kolom. Timbunan bubuk silika gel dalam kolom mencapai tiga perempat tinggi kolom. Perlakuan selanjutnya adalah fraksi *n*-butanol biji kakao sebanyak 500 mg dilarutkan dengan sedikit eluen kemudian di masukkan ke dalam kolom dan kran kromatografi kolom dibuka. Larutan sampel akan meresap ke silika gel dalam kolom sampai batas atas silika gel, selanjutnya dimasukkan eluen secara bertahap sambil kran kolom dibuka. Fraksi yang telah terpisah ditampung dalam botol vial sebanyak 5 mL. Setiap fraksi dianalisis dengan KLT untuk menentukan kemurnian senyawa yang diperoleh. Botol yang berisi jumlah komponen dan tinggi spot yang sama dikelompokkan menjadi satu wadah kemudian dievaporasi dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Mabrurroh dkk. 2019).

### Uji aktivitas antioksidan isolat biji kakao menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis

*Pembuatan larutan induk isolat biji kakao konsentrasi 100 ppm dan seri konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm (Suena dkk. 2021)*

Larutan induk isolat biji kakao konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara menimbang 2,5 mg isolat. Kemudian isolat dilarutkan dengan etanol 96% sampai tanda batas dalam labu ukur 25 mL. Larutan isolat dikocok hingga homogen. Larutan uji isolat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dibuat dengan cara masing-masing larutan induk konsentrasi 100 ppm dipipet sebanyak 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, dan 1 mL. Kemudian masing-masing larutan induk seri konsentrasi dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas. Lalu dikocok hingga homogen.

*Pembuatan larutan baku kerja DPPH konsentrasi 40 ppm*

Larutan baku kerja DPPH konsentrasi 40 ppm dibuat dengan cara ditimbang 2 mg serbuk DPPH. Kemudian serbuk DPPH dilarutkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas. Lalu dikocok hingga homogen.

*Penentuan panjang gelombang maksimum larutan baku kerja DPPH 40 ppm*

Penentuan panjang gelombang maksimum larutan baku kerja DPPH 40 ppm, dilakukan dengan cara larutan baku kerja DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 4 mL dimasukan ke dalam kuvet, lalu diamati spektrum serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm. Untuk larutan blanko digunakan 4 mL etanol 96%. Dari kurva serapan dapat ditentukan panjang gelombang maksimum

*Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-Vis*

Dilakukan terlebih dahulu pengukuran kontrol DPPH dengan cara larutan DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 2 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 2 mL etanol 96%, diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya, pengukuran aktivitas antioksidan sampel uji dilakukan dengan cara larutan DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 2 mL, dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambah 2 mL larutan uji dari masing-masing konsentrasi, diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum secara bergantian pada kelima konsentrasi. Absorbansi masing-masing dicatat, kemudian dari absorbansi tersebut dilakukan perhitungan persentase inhibisi. Dilakukan replikasi sebanyak 2 kali pada masing-masing isolat.

### Identifikasi senyawa golongan flavonoid pada isolat dengan pereaksi geser menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis (Markham 1988)

Sebanyak 2 ml isolat dimasukkan ke dalam kuvet diamati spektrumnya pada panjang gelombang 200–600 nm. Selanjutnya, isolat ditambahkan dengan NaOH 2 M sebanyak 3 tetes, kemudian dikocok hingga homogen lalu diamati spektrum sampel setelah penambahan NaOH 2M. Sampel didiamkan selama 5 menit dan diamati kembali spektrumnya. Campuran dibuang dan kuvet dibilas. Kemudian, isolat ditambahkan dengan 6 tetes  $\text{AlCl}_3$  lalu ukur spektrum sampel setelah penambahan  $\text{AlCl}_3$ . Selanjutnya isolat ditambahkan 3 tetes HCl, kemudian di kocok hingga homogen lalu ukur spektrum  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ . Campuran dibuang dan kuvet dibilas. Selanjutnya, isolat ditambahkan serbuk NaOAc sedemikian rupa sehingga terdapat kira-kira 2 mm lapisan NaOAc pada dasar kuvet, kemudian dikocok hingga serbuk larut lalu ukur spektrumnya. Pada tahap ini dapat diperiksa apakah cuplikan terurai dengan berjalannya waktu, seperti pada spektrum NaOH 2M. Kemudian ditambahkan serbuk  $\text{H}_3\text{BO}_3$  kira-kira setengah dari NaOAc, lalu ukur spektrum NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

### Analisis dan Pengolahan Data

Pada pengujian aktivitas antioksidan isolat biji kakao, parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah  $\text{IC}_{50}$  (*inhibition concentration*). Untuk menghitung nilai  $\text{IC}_{50}$  diperlukan data persentase peredaman yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi DPPH} - \text{Absorbansi Sampel Uji}}{\text{Absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

Berdasarkan nilai persentase peredaman pada masing-masing konsentrasi, kemudian data dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara nilai persentase peredaman dengan konsentrasi larutan untuk mendapatkan persamaan regresi linier sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

Selanjutnya akan diperoleh nilai  $\text{IC}_{50}$  dengan perhitungan dari persamaan regresi linier, dimana konsentrasi sampel (ppm) sebagai absis (sumbu x) dan nilai persentase peredaman sebagai ordinatnya (sumbu y). Nilai  $\text{IC}_{50}$  didapatkan dari perhitungan persentase peredaman sebesar 50% (Suena dkk. 2021). Setelah di peroleh nilai  $\text{IC}_{50}$ , maka selanjutnya dapat dihitung nilai AAI. Perhitungan nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) digunakan untuk mengetahui kekuatan  $\text{IC}_{50}$  dalam menghambat konsentrasi DPPH yang digunakan dalam penelitian dengan rumus:

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{\text{IC}_{50} \text{ sampel (ppm)}}$$

Pada pengujian secara kualitatif yaitu penentuan senyawa flavonoid pada isolat biji kakao dari Kromatografi kolom dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis. Sebanyak 2 mL isolat dimasukkan ke dalam kuvet, lalu dengan penambahan pereaksi geser dianalisis agar menunjukkan data adsorbansi maksimal pada panjang gelombang UV-Visibel (200-600 nm) (Syafitri dkk. 2022).

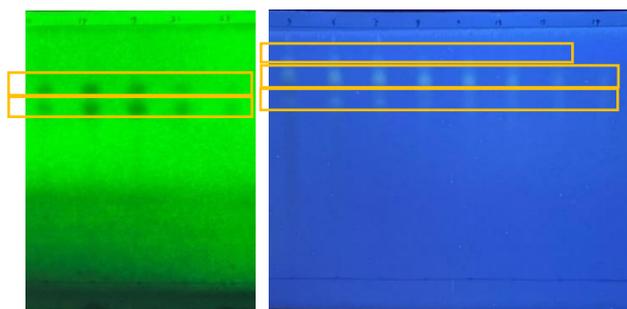
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Preparasi Sampel

Pada awal tahap penelitian, sampel dilakukan determinasi dahulu sehingga dapat dipastikan bahwa sampel yang diteliti adalah *Theobroma cacao L.* atau biasa dikenal dengan biji coklat. Selanjutnya dilakukan pengolahan sampel sehingga diperoleh serbuk biji kakao sebanyak 1.200 gram. Serbuk tersebut dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak kental diperoleh sebanyak 118,1 gram. Terhadap ekstrak kental tersebut dilakukan pemisahan senyawa menggunakan metode fraksinasi. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi adalah *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Pada penelitian ini dilanjutkan penggunaan fraksi *n*-butanol pada tahap selanjutnya dikarenakan fokus dari penelitian ini hanya mencari senyawa yang bersifat polar. Fraksi kental *n*-butanol biji kakao diperoleh sebanyak 7,004 gram.

### Hasil isolasi senyawa flavonoid pada fraksi *n*-butanol biji kakao

Proses isolasi diawali dengan melakukan uji kromatografi lapis tipis yang bertujuan untuk mencari fase gerak yang sesuai sehingga dapat digunakan dalam kromatografi kolom. Hasil fase gerak yang sesuai diperoleh yaitu *n*-butanol:asam asetat:air (3:1:1) dan fase diam yang digunakan adalah silika gel 60. Berdasarkan pemisahan fraksi *n*-butanol biji kakao menggunakan kromatografi kolom diperoleh hasil sebanyak 53 tampungan. Hasil pemisahan tersebut dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Isolat yang memiliki pola dan bentuk noda yang sama digabungkan menjadi satu sehingga dari hasil penggabungan didapat enam isolat gabungan. Isolat gabungan dari I1 sampai I6 yaitu: I1 (tampungan 1-2), I2 (tampungan 3-7), I3 (tampungan 8-13), I4 (tampungan 14-23), I5 (tampungan 24-29), dan I6 (tampungan 30-53). Hasil kromatografi lapis tipis isolat yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Kromatogram lapis tipis isolat hasil kolom di bawah sinar UV 254 nm (kiri) dan 366 nm (kanan)

**Tabel 1.** Hasil uji aktivitas antioksidan isolat biji kakao

Sampel	Replikasi	IC <sub>50</sub>	Rata-rata IC <sub>50</sub> (ppm)	AAI	Rata-rata AAI	Kategori
Isolat 1	1	9,56	9,36±0,89	4,18	4,30±0,43	Sangat kuat
	2	10,14		3,95		
	3	8,38		4,77		
Isolat 2	1	9,96	10,68±0,63	4,02	3,75±0,23	Sangat kuat
	2	11,13		3,59		
	3	10,96		3,65		
Isolat 3	1	14,02	13,26±1,47	2,85	3,04±0,36	Sangat kuat
	2	14,19		2,82		
	3	11,57		3,46		
Isolat 4	1	30,36	29,65±1,15	1,32	1,35±0,05	Kuat
	2	30,26		1,32		
	3	28,32		1,41		

#### Hasil uji aktivitas antioksidan pada isolat biji kakao

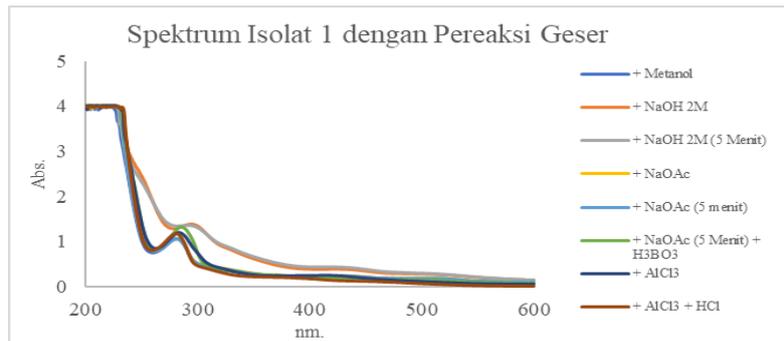
Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan bersifat sangat kuat jika memiliki IC<sub>50</sub> kurang dari 50 ppm, bersifat kuat jika nilai IC<sub>50</sub> berkisar antara 50-100 ppm, bersifat sedang jika nilai IC<sub>50</sub> berkisar antara 100-150 ppm dan bersifat lemah jika nilai IC<sub>50</sub> berkisar antara 150-200 ppm. Nilai IC<sub>50</sub> yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin besar (Moniung *et al.* 2022). Berdasarkan nilai AAI <0,5 maka antioksidan tergolong bersifat lemah. AAI > 0,5 maka antioksidan bersifat sedang. AAI > 1-2 maka antioksidan bersifat kuat dan AAI > 2 maka antioksidan sangat kuat (Mamay *et al.* 2022). Hasil uji aktivitas antioksidan isolat biji kakao dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> maka isolat 1, 2, 3, dan 4 tergolong bersifat sangat kuat sedangkan apabila dilihat dari nilai AAI, ketiga isolat tergolong bersifat sangat kuat kecuali isolat 4 yang tergolong bersifat kuat. Untuk isolat 5 dan 6 tidak memiliki aktivitas antioksidan, hal ini dikarenakan tidak adanya penghambatan terhadap radikal DPPH yang ditandai dengan tidak terjadinya penurunan absorbansi.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Iflahah dkk. (2016) mengenai uji aktivitas antioksidan dari fraksi *n*-butanol biji kakao diperoleh nilai IC<sub>50</sub> sebesar 170 ppm. Aktivitas antioksidan pada fraksi *n*-butanol masih dikatakan lemah. Kuat atau lemahnya aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat dipengaruhi beberapa faktor lingkungan diantaranya yaitu kondisi habitat yang meliputi cahaya, temperatur, salinitas dan media tanaman pada saat kultivasi (Novianti dkk. 2019). Selain itu, kandungan senyawa flavonoid akan mempengaruhi kekuatan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi kandungan flavonoid dalam suatu sampel, aktivitas antioksidannya juga akan semakin tinggi (Dewi dkk. 2018).

#### Hasil uji penentuan jenis senyawa flavonoid pada isolat 1

Hasil analisis spektrofotometri UV-Vis pada isolat 1 memberikan dua pita serapan yang karakteristik untuk senyawa flavonoid, yaitu serapan pada panjang gelombang 300-330 nm bahu (pita I) dan 281 nm (pita II). Berdasarkan nilai serapan yang ditunjukkan, kedua serapan yang dimiliki senyawa ini memenuhi kriteria rentang senyawa flavonoid golongan flavanon atau dihidroflavonol yaitu pita II



**Gambar 2.** Spektrum isolat 1 dengan pereaksi geser

**Tabel 2.** Hasil penafsiran spektrum flavonoid pada isolat 1

Pereaksi	Panjang gelombang $\lambda_{maks}$ (nm) dan abs		Pergeseran panjang gelombang $\lambda_{maks}$ (nm) dan abs		Penafsiran
	Pita I	Pita II	Pita I	Pita II	
	Metanol	300-330 bahu	281 (abs:1,0494)		
+ NaOH 2M	300-330 bahu	294 (abs:1,3777)	-	+13 (+0,3283)	-
+ NaOH 2M (5 menit)	300-330 bahu	291 (abs:1,362)	-	+10 (-0,0157)	<i>o</i> -diOH pada cincin A (penurunan lambat: <i>o</i> -diOH pada cincin B isoflavon)
+ NaOAc	300-330 bahu	280 (abs:1,0622)	-	-1 (+0,0128)	-
+ NaOAc (5 menit)	300-330 bahu	280 (abs:1,0519)	-	-1 (-0,0103)	Gugus yang peka terhadap basa, mis. 6,7 atau 7,8-diOH
+ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300-330 bahu	285 (abs:1,3254)	-	+4 (+0,276)	-
+ AlCl <sub>3</sub>	300-330 bahu	283 (abs:1,2016)	-	+2 (+0,1522)	-
HCl	300-330 bahu	283 (abs:1,1564)	-	+2 (+0,107)	-

berkisar antara 275-295 nm dan pita I berkisar antara 300-330 nm bahu. Pada penambahan NaOH 2M terjadi pergeseran hipsokromik pada pita II sebesar 13 nm dan pita I juga mengalami pergeseran hipsokromik dan peningkatan absorbansi. Setelah 5 menit, pita II mengalami pergeseran batokromik menjadi 291 nm dan penurunan absorbansi. Spektrum NaOH merupakan spektrum flavonoid yang gugus hidroksil fenolnya mengalami ionisasi sampai batas tertentu. Karena itu, spektrum ini biasanya merupakan petunjuk 'sidik jari' pola hidroksilasi dan juga bermanfaat untuk mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Degradasi atau pengurangan kekuatan spektrum setelah waktu tertentu merupakan petunjuk baik akan adanya gugus yang peka terhadap basa. Hal ini menandakan apabila kekuatan menurun dengan berjalannya waktu berarti

terdapat orto dihidroksi pada cincin A (penurunan lambat menandakan terdapat orto dihidroksi pada cincin B isoflavon) (Markham 1988).

Pada penambahan NaOAc, terjadi pergeseran batokromik pada pita II menjadi 280 nm dan setelah 5 menit, tidak terjadi pergeseran. Pada pita I mengalami pergeseran hipsokromik dan setelah 5 menit, tidak terjadi pergeseran tetapi mengalami penurunan absorbansi. Hal ini menandakan terdapat gugus yang peka terhadap basa, misalnya gugus 6,7 atau 7,8 dihidroksi. Pada penambahan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan literatur. Spektrum 'NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>' menjadi penghubung kedua gugus hidroksil pada gugus *o*-dihidroksi. Hasil yang tidak sesuai, kemungkinan disebabkan karena pereaksi ini tidak mampu menjembatani kedua gugus

hidroksil pada gugus o-dihidroksi sehingga sulit untuk mendeteksinya (Markham 1988).

Pada penambahan  $AlCl_3$ , hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan literatur. Hal ini dikarenakan tidak terbentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga dan tidak terbentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto-dihidroksil. Pereaksi ini digunakan untuk mendeteksi kedua gugus tersebut. Jadi, spektrum ' $AlCl_3$ ' merupakan penjumlahan pengaruh semua kompleks terhadap spektrum. Pada penambahan pereaksi HCl, hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan literatur dikarenakan spektrum ' $AlCl_3/HCl$ ' hanya merupakan pengaruh kompleks hidroksi-keto (Markham, 1988). Berdasarkan hasil penafsiran spektrum pada isolat 1, maka dugaan senyawa flavonoid yang terkandung dalam isolat 1 adalah golongan flavanon atau dihidroflavonol dengan jenis 6,7-dihidroksi flavanon/ dihididroksi dihidroflavonol atau 7,8- dihidroksi flavanon/ dihididroksi dihidroflavonol yang terdapat orto dihidroksi pada cincin A dan B.

#### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan dilihat berdasarkan nilai AAI pada isolat 1 diperoleh sebesar  $4,30 \pm 0,43$  (sangat kuat), isolat 2 sebesar  $3,75 \pm 0,23$  (sangat kuat), isolat 3 sebesar  $3,04 \pm 0,36$  (sangat kuat) dan isolat 4 sebesar  $1,35 \pm 0,05$  (kuat). Hasil penentuan jenis flavonoid menggunakan pereaksi geser diperoleh hasil bahwa isolat 1 merupakan senyawa golongan flavanon atau dihidroflavonol dengan jenis 6,7-dihidroksi flavanon/ dihididroksi dihidroflavonol atau 7,8- dihidroksi flavanon/ dihididroksi dihidroflavonol yang terdapat orto dihidroksi pada cincin A dan B.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih sebesar-besarnya diucapkan kepada laboran Kimia Farmasi dan Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar yang telah membantu dan mendukung dalam penelitian dan penyusunan artikel ilmiah ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Banjarnahor, S.D. & Artanti, N. (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*. **23(4)**: 239-44.
- Dewi, S.R., Argo, B.D. & Ulya, N. (2018). Kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak *Pleurotus ostreatus*. *Rona Teknik Pertanian*. **11(1)**: 1-10.
- Iflahah, M.A., Puspawati, N.M., Suaniti, N.M., Terapan, M.K., Udayana, P.U., Udayana, U. & Jimbaran, B. (2016). Aktivitas antioksidan biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menurunkan kadar 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin dalam urin tikus setelah terpapar etanol. *Cakra Kimia*. **4(2)**: 113-119.
- Indiarto, R., Pranoto, Y. & Santoso, U. (2019). In vitro antioxidant activity and profile of polyphenol compounds extracts and their fractions on *Cacao Beans*. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. **22(1)**: 34-44.
- Layal, K., Perdhana, I.S., Louisa, M., Estuningtyas, A. & Soetikno, V. (2017). The effects of quercetin on oxidative stress and fibrosis markers in chronic kidney disease rat model. *Medical Journal of Indonesia*. **26(3)**: 169-177.
- Mabruroh, E.Q., Mursiti, S. & Kusumo, E. (2019). Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari *Daun Murbei (Morus alba* Linn). *Indonesian Journal of Chemical Science*. **8(1)**: pp. 16-22.
- Mamay, M., Wardani, D. & Hakim, F. (2020). Aktivitas antioksidan total pada ekstrak etanol daun bambu surat (*Gigantochloa pseudoarundinaceae*). *Jurnal Kesehatan Perintis*. **9(1)**: 47-52.
- Markham, K.R. (1988) *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. ITB. Bandung
- Moniung, P., Singkoh, M. & Butarbutar, R. (2022). Potensi alga halymenia durvillei sebagai sumber antioksidan alami. *Jurnal Bios Logos*. **12(1)**: 39-45.
- Novianti, T., Zainuri, M. & Widowati, I. (2019). Aktivitas antioksidan dan identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak kasar mikroalga chlorella vulgaris yang dikultivasi berdasarkan sumber cahaya yang berbeda. *Barakuda'45*. **1(2)**. 72-87.
- Oktapiya, T.R. & Pratama, N.P. (2022). Analisis fitokimia dan kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Sasambo Journal of Pharmacy*. **3(2)**: 105-110.
- Pratyaksa, I.P.L., Putra, G.P.G. & Suhendra, L. (2020). Karakteristik ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai sumber antioksidan pada perlakuan ukuran partikel dan waktu maserasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. **8(1)**: 139-149.
- Riskiana, N.P.Y.C. & Vifta, R.L. (2021). Kajian pengaruh pelarut terhadap aktivitas antioksidan alga coklat genus sargassum dengan metode DPPH. *Journal of Holistics and Health Sciences (JHHS)*. **3(2)**: 201-213.
- Suena, N.M.D.S., Suradnyana, I.G.M. & Juanita, R. A. (2021). Formulasi dan uji aktivitas antioksidan granul effervescent dari kombinasi ekstrak kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dan kunyit kuning (*Curcuma longa* l.). *Jurnal Ilmiah Medicamento*. **7(1)**: 32-40.
- Syafitri, Y., Wasanti, I. H. I. & Puspasari, H. (2022). Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid madu hutan (*Apis dorsata*) Kapuas Hulu dengan metode KLT dan spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Farmasi Sains dan Terapan (Journal of Pharmacy Science and Practice)*. **9(1)**: 17-23.
- Titit, M.B., Fachriyah, E. & Kusriani, D. (2013). Isolasi, identifikasi dan uji aktifitas senyawa

- alkaloid daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis). *Chem Info*. **1(1)**: 196-201.
- Winahyu, D.A., Retnaningsih, A. & Aprillia, M. (2019). Penetapan kadar flavonoid pada kulit batang kayu raru (*Cotylelobiummelanoxylon*P) dengan metode spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Analis Farmasi*. **4(1)**: 29-36.
- Zaetun, S., Dewi, L.B.K., Wiadnya, I.B.R. & Gede, L.S. (2019). Profil kadar Mda (Malondialdehyde) sebagai penanda kerusakan seluler akibat radikal bebas pada tikus yang diberikan air beroksigen. *Jurnal Analis Medika Biosains (JAMBS)*. **4(2)**: 63-68.
-