

Determination of Catechin Content and Antioxidant Activity of Brewed and Ethanolic Extracts of Cacao Beans (*Theobroma cacao* L.) Using Uv-Vis Spectrophotometry

Penetapan Kadar Katekin dan Uji Aktivitas Antioksidan Dari Seduhan dan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Secara Spektrofotometri Uv-Vis

Dahnia Ayu Fitria ^a, Anny Sartika Daulay ^a, Ridwanto ^a, Haris Munandar Nasution ^a

^a Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah, Medan, Sumatera Utara, Indonesia.

*Corresponding Authors: annysartika@umnaw.ac.id

Abstract

Introduction: Cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) are widely recognized as a rich source of bioactive polyphenolic compounds, particularly flavan-3-ols such as catechin and epicatechin, which exhibit potent antioxidant properties. These secondary metabolites play a critical role in neutralizing free radicals, thereby mitigating oxidative stress implicated in various degenerative diseases. **Objective:** This study aimed to compare catechin equivalent content and DPPH radical scavenging activity between ethanolic extract (maceration with 70% ethanol) and aqueous infusion (90°C, 15 min) of cocoa beans. **Methods:** Phytochemical screening was conducted qualitatively. Catechin equivalent content was determined using UV-Vis spectrophotometry at 280 nm, while antioxidant activity was evaluated using the DPPH method at 515 nm with vitamin C as positive control. **Results:** Both samples contained alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, triterpenoids/steroids, polyphenols, and glycosides. The ethanolic extract exhibited higher catechin equivalent content ($37.15 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$) compared to the infusion ($19.83 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$), corresponding to $12.53 \pm 0.72 \text{ mg/g}$ and $11.18 \pm 1.72 \text{ mg/g}$, respectively. The DPPH assay revealed superior antioxidant activity for the ethanolic extract ($\text{IC}_{50} = 83.29 \mu\text{g/mL}$; strong category) compared to the infusion ($\text{IC}_{50} = 192.65 \mu\text{g/mL}$; weak category), with vitamin C showing $\text{IC}_{50} = 2.95 \mu\text{g/mL}$ (very strong). **Conclusion:** Ethanolic maceration is more effective than aqueous infusion for extracting catechin equivalents and achieving higher antioxidant activity from cocoa beans. Further confirmation using HPLC-DAD or LC-MS is recommended to validate specific catechin concentrations.

Keywords: Cocoa beans, Catechin, Antioxidant, DPPH, UV-Vis Spectrophotometry.

Abstrak

Pendahuluan: Biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dikenal sebagai sumber senyawa bioaktif polifenol yang kaya, khususnya flavan-3-ol seperti katekin dan epikatekin, yang memiliki aktivitas antioksidan potensial. Metabolit sekunder ini berperan penting dalam menetralkan radikal bebas, sehingga mengurangi stres oksidatif yang terkait dengan berbagai penyakit degeneratif. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan membandingkan kadar setara katekin dan aktivitas peredaman radikal DPPH antara ekstrak etanol (maserasi dengan etanol 70%) dan infusa akuades (90°C, 15 menit) biji kakao. **Metode:** Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif. Kadar setara katekin ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada 280 nm, sedangkan aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH pada 515 nm menggunakan vitamin C sebagai kontrol positif. **Hasil:** Kedua sampel mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid/steroid, polifenol, dan glikosida. Ekstrak etanol menunjukkan kadar setara katekin lebih tinggi ($37,15 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) dibandingkan infusa ($19,83 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$), setara dengan $12,53 \pm 0,72 \text{ mg/g}$ dan $11,18 \pm 1,72 \text{ mg/g}$. Uji DPPH menunjukkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol ($\text{IC}_{50} = 83,29 \mu\text{g/mL}$; kategori kuat) superior dibandingkan infusa ($\text{IC}_{50} = 192,65 \mu\text{g/mL}$; kategori lemah), dengan vitamin C menunjukkan $\text{IC}_{50} = 2,95 \mu\text{g/mL}$ (sangat kuat). **Kesimpulan:** Maserasi etanol lebih efektif daripada infusa akuades untuk mengekstraksi setara katekin dan menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari biji kakao. Konfirmasi lebih lanjut menggunakan HPLC-DAD atau LC-MS direkomendasikan untuk memvalidasi konsentrasi katekin spesifik.

Kata Kunci: Biji kakao, Katekin, Antioksidan, DPPH, Spektrofotometri UV-Vis.



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Article History:

Received: 20/05/2026,
Revised: 28/07/2026
Accepted: 29/07/2026,
Available Online: 31/07/2026.

QR access this Article



<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v9i3.1763>

Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan komoditas perkebunan tropis bernilai ekonomi tinggi yang dimanfaatkan secara luas dalam industri pangan dan minuman. Selain menjadi bahan baku utama produk coklat, biji kakao merupakan sumber senyawa bioaktif, terutama polifenol. Fraksi polifenol biji kakao didominasi oleh flavan-3-ol, seperti katekin dan epikatekin, serta procyanidin oligomerik yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Kandungan senyawa tersebut tidak bersifat konstan karena dipengaruhi oleh genotipe, asal geografis, tingkat kematangan, fermentasi, pengeringan, dan kondisi pengolahan pascapanen [1,2].

Katekin merupakan senyawa flavan-3-ol yang memiliki beberapa gugus hidroksil fenolik dan mampu mendonorkan atom hidrogen atau elektron untuk menstabilkan spesies radikal. Meskipun demikian, katekin relatif rentan terhadap oksidasi, epimerisasi, dan degradasi akibat paparan oksigen, cahaya, perubahan pH, serta suhu tinggi. Karakteristik tersebut menyebabkan kadar katekin yang terukur dan kapasitas antioksidan biji kakao sangat bergantung pada kondisi bahan dan prosedur penyarian yang diterapkan [3–7].

Variabilitas flavanol biji kakao telah ditunjukkan dalam sejumlah penelitian. Othman et al. [8] melaporkan bahwa kadar epikatekin biji kakao mentah dari Malaysia, Ghana, Pantai Gading, dan Sulawesi berkisar antara 270–1.235 mg/100 g atau setara dengan 2,70–12,35 mg/g, dengan kadar tertinggi ditemukan pada sampel asal Sulawesi. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol menghasilkan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak air. Nilai *Trolox-equivalent antioxidant capacity* ekstrak etanol berada pada kisaran 34,98–43,96 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$, sedangkan ekstrak air hanya mencapai 13,98–21,85 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$. Pola yang serupa diperoleh pada pengujian FRAP, yaitu 77,47–143,37 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{ g}$ untuk ekstrak etanol dan 54,22–80,21 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{ g}$ untuk ekstrak air. Selain itu, kandungan epikatekin menunjukkan korelasi positif yang kuat dengan kapasitas antioksidan, baik pada ekstrak etanol maupun ekstrak air.

Perbedaan kandungan senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan juga dilaporkan pada biji kakao asal Indonesia. Ekstrak etanol 70% dari empat klon biji kakao tidak terfermentasi asal Sulawesi Selatan memiliki kandungan polifenol total sebesar 49,25–86,11 mg/g dan nilai IC_{50} DPPH sebesar 6,40–10,23 $\mu\text{g/mL}$ [9]. Pada biji kakao edel asal Jember, ekstrak etanol biji terfermentasi dan tidak terfermentasi masing-masing menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 33,97 dan 9,56 $\mu\text{g/mL}$ [10]. Indiarto et al. [11] selanjutnya melaporkan bahwa aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak dan fraksi biji kakao bervariasi dengan nilai IC_{50} sebesar 7,74–30,94 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan fraksi air menunjukkan kandungan polifenol, flavonoid, dan aktivitas antioksidan yang lebih rendah dibandingkan fraksi dengan polaritas menengah [12]. Temuan tersebut memperlihatkan bahwa perbedaan bahan, tingkat fermentasi, pelarut, dan proses ekstraksi dapat menghasilkan variasi yang substansial pada parameter kimia dan aktivitas antioksidan biji kakao [13].

Maserasi menggunakan etanol 70% dan penyarian secara infusa memiliki mekanisme ekstraksi yang berbeda. Sistem etanol–air mampu memfasilitasi penetrasi pelarut ke dalam matriks sekaligus melarutkan senyawa fenolik dengan rentang polaritas yang relatif luas. Sebaliknya, infusa mengandalkan air dan suhu tinggi untuk mempercepat perpindahan massa senyawa yang bersifat hidrofilik. Pemanasan dapat meningkatkan pelepasan komponen terlarut dari jaringan [14], tetapi juga berpotensi mempercepat oksidasi, epimerisasi, atau degradasi flavanol yang sensitif terhadap panas. Oleh karena itu, perbedaan kadar katekin dan aktivitas antioksidan antara kedua metode tidak hanya ditentukan oleh polaritas pelarut, tetapi juga oleh suhu, waktu kontak, rasio bahan terhadap pelarut, dan stabilitas senyawa selama penyarian.

Meskipun kandungan flavanol dan aktivitas antioksidan biji kakao telah banyak dilaporkan, sebagian besar penelitian menggunakan ekstraksi etanol, pelarut organik, atau teknik fraksinasi. Bukti komparatif

mengenai kadar katekin dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan infusa yang diperoleh dari bahan baku yang sama dan dievaluasi pada kondisi analisis yang setara masih terbatas. Perbandingan tersebut diperlukan untuk menentukan sejauh mana metode penyarian berkontribusi terhadap perolehan katekin dan kemampuan penangkapan radikal bebas biji kakao. Berdasarkan kesenjangan tersebut, penelitian ini bertujuan mengidentifikasi golongan metabolit sekunder dalam serbuk simplisia dan ekstrak etanol biji kakao, menentukan serta membandingkan kadar katekin pada ekstrak etanol dan infusa menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dan mengevaluasi aktivitas antioksidan kedua hasil penyarian menggunakan metode DPPH. Penelitian ini diharapkan memberikan bukti eksperimental mengenai hubungan antara metode penyarian, kadar katekin terukur, dan aktivitas antioksidan biji kakao.

Metode Penelitian

Proses pengambilan dan pengolahan sampel adalah bagian dari jenis penelitian ini. setelah sampel dikeringkan menggunakan metode pengering, dilakukan uji karakterisasi simplisia, kemudian pembuatan ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki tekstur semi-padat/pasta akibat tingginya kandungan lemak kakao (*cocoa butter*) serta potensi sisa pelarut/air yang belum teruapkan secara sempurna, dan skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Setelah skrining fitokimia selesai, uji penetapan kadar katekin dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan infusa biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dilakukan dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan spektrofotometri UV-Vis.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, sudip, lemari pengering, rotary evaporator, batang pengaduk, tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, beaker glass, rak tabung, pipet tetes, corong, panci infusa, penangas air, sendok tanduk, kertas saring, perkamen, hot plate, cawan porselin, blender, termometer, kertas saring bebas abu, desikator, tanur, krus tang, cawan krus, oven, parkamen, kertas saring, lampu bunsen, object glass, deck glass, kaca arloji, labu ukur, mat pipet, corong pisah, tissue lensa dan spektrofotometri UV-Vis. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.), infusa aquadest biji kakao (*Theobroma cacao* L.), katekin, DPPH (2,2 diphenyl- 1-picrylhydrazyl), metanol pa, FeCl₃, asam klorida pekat, air suling, toluena, etanol 70% , etanol absolut, asam sulfat pekat, besi III (klorida), amonium hidroksida, asam asetat anhidrida, asam asetat pekat, asam nitrat pekat, α -naftol, kloralhidrat, eter, iodium, kalium iodida, kloroform, natrium hidroksida, natrium sulfat anhidrat, asam asetat glasial, raksa (III) klorida, serbuk Mg, sodium hidrogen sulfat dan timbal asetat.

Pengolahan Sampel

Buah kakao dibelah dan bijinya dipisahkan dari bagian buah lainnya. Biji kakao dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan sisa pulp yang melekat, kemudian ditiriskan dan dikeringkan untuk mengurangi kadar air serta mencegah pertumbuhan mikroorganisme selama penyimpanan. Biji kakao yang telah kering selanjutnya dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk simplisia. Serbuk tersebut digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol dan infusa, karakterisasi simplisia, skrining fitokimia, penetapan kadar katekin, serta pengujian aktivitas antioksidan [15,16].

Analisis Kuantitatif Katekin

Larutan baku induk katekin 1.000 $\mu\text{g/mL}$ dibuat dengan melarutkan 10 mg katekin dalam etanol absolut hingga 10 mL. Larutan tersebut diencerkan menjadi 20, 30, 40, 50, dan 60 $\mu\text{g/mL}$. Absorbansi diukur pada 280 nm menggunakan etanol absolut sebagai blanko, kemudian hubungan konsentrasi-absorbansi dianalisis dengan regresi linear [1,2].

Sebanyak 25 mg ekstrak etanol dilarutkan dalam etanol absolut hingga 25 mL, kemudian 1 mL larutan diencerkan hingga 10 mL. Infusa disaring dan diencerkan dengan etanol absolut hingga responsnya berada dalam rentang kurva kalibrasi. Setiap larutan sampel diukur enam kali pada kondisi yang sama. Konsentrasi dihitung menggunakan persamaan regresi dan dilaporkan sebagai katekin ekuivalen dalam larutan ukur (rerata $\pm$ SD), karena pengukuran langsung pada 280 nm dapat mencakup kontribusi senyawa fenolik lain.

Karakterisasi Simplisia

Identifikasi simplisia dilakukan dengan memeriksa pemerian dan melakukan pengamatan simplisia baik secara makroskopik maupun secara mikroskopik penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu, penetapan kadar abu tidak larut asam, selanjutnya dilakukan skrining fitokimia [17].

Karakterisasi Simplisia Biji Kakao

Karakterisasi simplisia biji kakao meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis serta penetapan kadar air, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut dalam asam. Pemeriksaan makroskopis dilakukan secara organoleptik dengan mengamati bau, bentuk, rasa, tekstur, ukuran, dan warna simplisia [18]. Pemeriksaan mikroskopis dilakukan terhadap serbuk simplisia biji kakao dengan meletakkan sejumlah serbuk di atas kaca objek dan menambahkan larutan kloral hidrat. Preparat dipanaskan secara hati-hati di atas nyala Bunsen selama beberapa menit, ditutup menggunakan kaca penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop untuk mengidentifikasi fragmen diagnostik simplisia [19].

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan metode destilasi azeotropi. Sebanyak 200 mL toluena dan 2 mL air suling dimasukkan ke dalam labu destilasi, kemudian didestilasi selama 2 jam hingga seluruh air terdestilasi. Setelah proses destilasi dihentikan, perangkat dibiarkan mendingin selama 30 menit dan volume air pada tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 mL sebagai volume awal (V_1), sehingga diperoleh toluena jenuh air. Sebagian toluena digunakan untuk membilas bagian dalam perangkat destilasi. Selanjutnya, sebanyak 5 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam labu dan dipanaskan secara perlahan selama 15 menit. Setelah toluena mulai mendidih, destilasi dilakukan dengan kecepatan sekitar dua tetes per detik hingga sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan ditingkatkan menjadi sekitar empat tetes per detik. Setelah seluruh air terdestilasi, bagian dalam tabung dibilas dengan toluena dan proses destilasi dilanjutkan selama 5 menit. Pemanasan dihentikan dan perangkat dibiarkan mencapai suhu kamar hingga lapisan air dan toluena terpisah secara sempurna. Volume akhir air dicatat sebagai V_2 . Kandungan air dalam sampel ditentukan berdasarkan selisih antara V_2 dan V_1 , sedangkan kadar air dihitung sebagai persentase terhadap bobot awal simplisia [19].

Penetapan kadar sari larut air dilakukan dengan memaserasi 5 g serbuk simplisia dalam 100 mL campuran air–kloroform yang dibuat dari 2,5 mL kloroform dan air suling hingga 100 mL. Maserasi dilakukan dalam labu Erlenmeyer tertutup selama 24 jam, dengan pengocokan selama 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam berikutnya. Campuran kemudian disaring dan sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan dan ditara. Residu dikeringkan pada suhu 105 °C hingga mencapai bobot tetap. Kadar sari larut air dihitung sebagai persentase terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan [19].

Penetapan kadar sari larut etanol dilakukan dengan memaserasi 5 g serbuk simplisia dalam 100 mL etanol 96% selama 24 jam dalam labu Erlenmeyer tertutup. Campuran dikocok selama 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam berikutnya, kemudian disaring. Sebanyak 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan dan ditara. Residu dikeringkan pada suhu 105 °C hingga mencapai bobot tetap. Kadar sari larut etanol dihitung sebagai persentase terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan [19].

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan menimbang sebanyak 2 g serbuk simplisia dan memasukkannya ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara. Sampel diratakan, kemudian dipijarkan secara bertahap pada suhu sekitar 600 °C hingga seluruh bahan organik terdestruksi dan diperoleh abu. Krus selanjutnya didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Proses pemijaran, pendinginan, dan penimbangan diulangi hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu total dihitung sebagai persentase terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan di udara [19]. Penetapan kadar abu tidak larut dalam asam dilakukan menggunakan abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total. Abu dididihkan bersama 25 mL asam klorida 2 N selama 5 menit. Fraksi yang tidak larut dalam asam disaring menggunakan kertas saring bebas abu dan dicuci dengan air panas. Residu beserta kertas saring kemudian dipijarkan hingga mencapai bobot tetap, didinginkan dalam desikator, dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam dihitung sebagai persentase terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan di udara [19].

Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Proses pembuatan ekstrak etanol biji kakao dilakukan dengan secara maserasi, ditimbang 500 gram serbuk simplisia biji kakao dimasukkan ke dalam wadah tertutup, setelah itu dituangkan dengan 75 bagian

etanol 70% sebanyak 3750 mL sambil diaduk sesekali, ditutup dan dibiarkan 5 hari terlindung dari cahaya. Setelah 5 hari diserkai, diperas, dengan kain flanel sehingga dapat maserat 1. Kemudian dibilas ampas maserat 1 dengan etanol 70% sebanyak 1250 mL, digabungkan maserat 1 dan maserat 2 selama 2 hari. Diserkai kembali, dipekatkan dengan menggunakan alat rotary evaporator 50°C hingga diperoleh ekstrak kental [20].

Pembuatan Infusa Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Sebanyak 10 gram simplisia biji kakao (*Theobroma cacao* L.) ditimbang dan ditambahkan aquadest 100 mL. Simplisia direbus diatas panci infusa selama 15 menit dengan suhu 90°C sambil sesekali diaduk menggunakan batang pengaduk. Setelah dingin, larutan disaring menggunakan kain flanel, hasil larutan yang disaring dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat [21].

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi secara kualitatif golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia dan ekstrak biji kakao. Pemeriksaan mencakup identifikasi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, triterpenoid/steroid, dan glikosida.

Identifikasi polifenol dilakukan dengan menambahkan 1 mL larutan FeCl_3 1% pada masing-masing 0,5 g serbuk simplisia dan ekstrak. Terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru kehitaman, atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa polifenol dalam sampel [22]. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menambahkan 100 mL air panas pada masing-masing 1 g serbuk simplisia dan ekstrak, kemudian campuran dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Sebanyak 5 mL filtrat ditambahkan serbuk magnesium, 1 mL HCl pekat, dan 2 mL amil alkohol. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga terbentuk pemisahan lapisan. Terbentuknya warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan hasil positif terhadap flavonoid [23].

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menambahkan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL air suling pada masing-masing 0,5 g serbuk simplisia dan ekstrak. Campuran dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk pengujian alkaloid menggunakan pereaksi spesifik.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil Identifikasi Tumbuhan

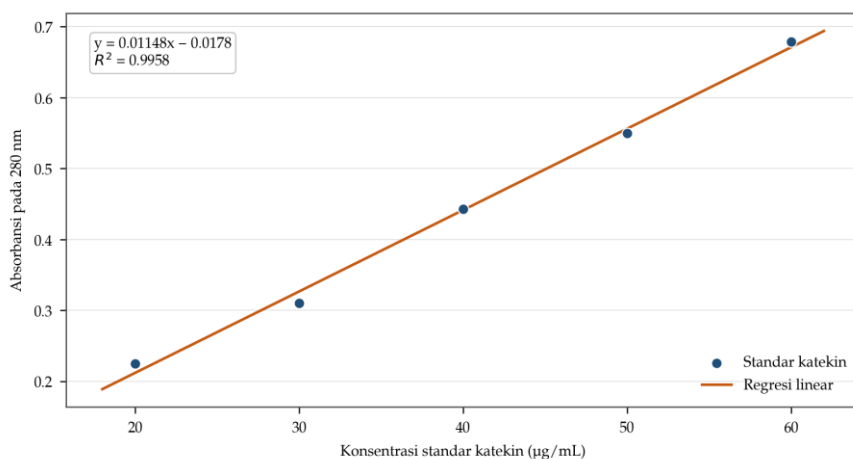
Hasil identifikasi tumbuhan yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Herbarium Medanense (MEDA), Universitas Sumatera Utara, berdasarkan Surat Hasil Identifikasi Nomor 008/MEDA/2025 tanggal 9 Januari 2025, mengonfirmasi bahwa sampel penelitian merupakan *Theobroma cacao* L. (nama lokal: coklat). Sampel tersebut diklasifikasikan ke dalam Kingdom Plantae, Divisi Spermatophyta, Kelas Dicotyledoneae, Ordo Malvales, Famili Malvaceae, dan Genus *Theobroma*. Konfirmasi identitas taksonomi ini menjamin autentisitas bahan tumbuhan yang digunakan serta meminimalkan potensi kesalahan identifikasi yang dapat memengaruhi validitas dan keterulangan hasil penelitian.

Kurva Kalibrasi Katekin dan Persamaan Regresi

Penetapan katekin ekuivalen dilakukan pada 280 nm menggunakan kurva kalibrasi standar katekin. Kurva menghasilkan persamaan $y = 0,01148x - 0,0178$ dengan $R^2 = 0,9958$. Konsentrasi pada larutan ukur dihitung dari persamaan tersebut dan disajikan sebagai rerata dari enam pengukuran.

Tabel 1. Data kurva kalibrasi standar katekin pada 280 nm

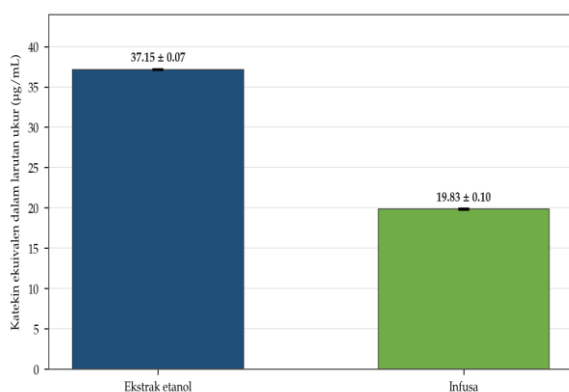
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
20	0,225
30	0,310
40	0,443
50	0,550
60	0,679



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar katekin pada 280 nm.

Tabel 2. Konsentrasi katekin ekuivalen dalam larutan ukur

Sampel	Katekin ekuivalen (µg/mL), rerata	
Ekstrak etanol	6	37,15 ± 0,07
Infusa	6	19,83 ± 0,10



Gambar 2. Konsentrasi katekin ekuivalen dalam larutan ukur

Penetapan Katekin Ekuivalen

Kurva kalibrasi menunjukkan hubungan linear yang kuat pada rentang 20–60 µg/mL ($R^2 = 0,9958$). Meskipun nilai tersebut mendukung penggunaan persamaan regresi untuk interpolasi, linearitas saja belum merupakan validasi metode yang lengkap. Akurasi, presisi antarhari, batas deteksi, batas kuantifikasi, selektivitas, dan perolehan kembali tetap diperlukan apabila metode akan digunakan sebagai prosedur kuantitatif tervalidasi. Pada penelitian ini, presisi pembacaan ditunjukkan oleh simpangan baku yang rendah: ekstrak etanol $37,15 \pm 0,07$ µg/mL dan infusa $19,83 \pm 0,10$ µg/mL pada larutan ukur, dengan koefisien variasi masing-masing sekitar 0,19% dan 0,51%.

Respons katekin ekuivalen ekstrak etanol sekitar 1,87 kali lebih tinggi daripada infusa. Perbedaan numerik tersebut menunjukkan bahwa kondisi penyarian dengan etanol menghasilkan lebih banyak komponen yang memberikan serapan setara katekin pada 280 nm. Hal ini sejalan dengan laporan Othman et al., yang menunjukkan bahwa jenis pelarut memengaruhi kandungan fenolik dan kapasitas antioksidan ekstrak biji kakao; ekstrak etanol memberikan aktivitas penangkapan radikal dan daya reduksi lebih tinggi, sedangkan ekstrak air dapat menunjukkan respons berbeda bergantung pada prinsip pengujian [35]. Efisiensi penyarian dipengaruhi tidak hanya oleh polaritas pelarut, tetapi juga rasio bahan–pelarut, suhu, waktu kontak, ukuran partikel, dan kondisi matriks. Oleh karena itu, perbandingan pada penelitian ini berlaku untuk prosedur ekstraksi yang digunakan dan tidak dapat digeneralisasi sebagai keunggulan mutlak etanol pada seluruh kondisi.

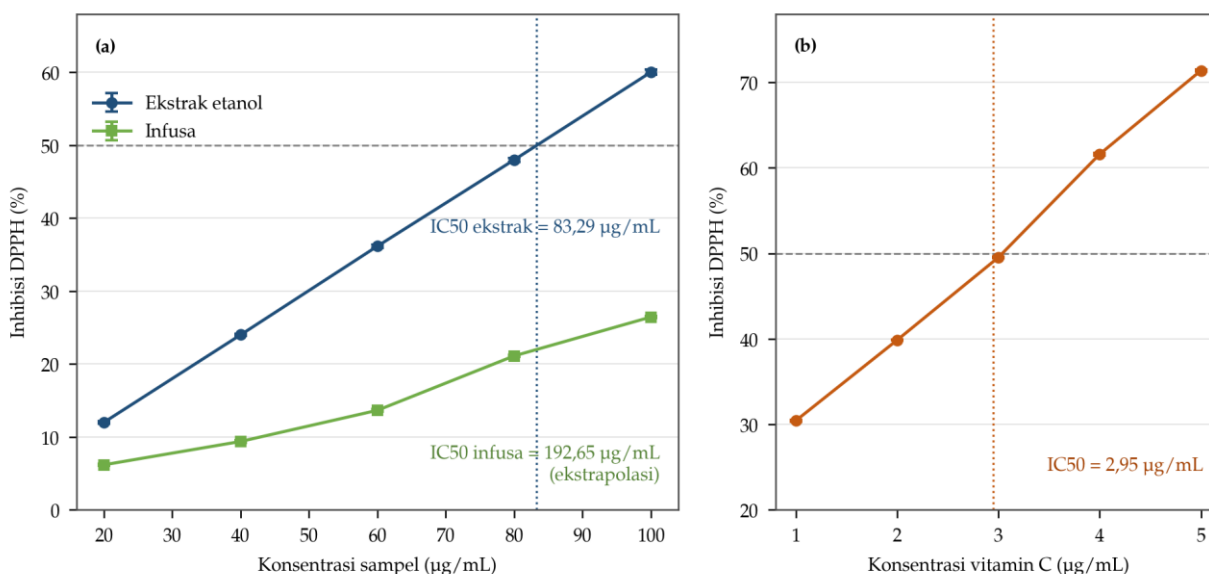
Penafsiran hasil pada 280 nm memerlukan kehati-hatian. Daerah tersebut merupakan pita serapan aromatik yang juga dapat memberikan respons terhadap epikatekin, procyanidin, flavonoid lain, asam

fenolat, dan sebagian komponen matriks kakao. Dengan demikian, nilai 37,15 dan 19,83 $\mu\text{g/mL}$ lebih tepat dinyatakan sebagai konsentrasi katekin ekuivalen dalam larutan ukur, bukan kadar katekin individual dalam bahan. Gottumukkala et al. menggunakan HPLC fase terbalik dengan deteksi 280 nm untuk memisahkan katekin dan epikatekin sebelum kuantifikasi, yang menegaskan pentingnya tahap pemisahan kromatografi untuk memperoleh spesifisitas analitik [34]. Penggunaan HPLC-DAD atau LC-MS pada penelitian lanjutan diperlukan untuk mengonfirmasi identitas, menentukan kadar katekin dan epikatekin secara terpisah, serta mengevaluasi kemungkinan interferensi matriks.

Variasi kadar flavan-3-ol pada kakao juga dipengaruhi riwayat pascapanen. Payne et al. menunjukkan bahwa fermentasi menurunkan katekin dan epikatekin secara substansial, sedangkan pemanasan dapat mengubah rasio epikatekin/katekin melalui degradasi dan epimerisasi [36]. Oleh sebab itu, nilai yang diperoleh pada penelitian ini tidak hanya mencerminkan pemilihan pelarut, tetapi juga dapat membawa pengaruh genotipe, kematangan, fermentasi, pengeringan, dan penyimpanan bahan. Informasi rinci mengenai faktor-faktor tersebut perlu dilaporkan pada penelitian lanjutan agar perbandingan antarpublikasi lebih bermakna.

Tabel 3. Persentase inhibisi DPPH ekstrak etanol dan infusa (n = 6)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Ekstrak etanol (%), rerata $\pm$ SD	Infusa (%), rerata $\pm$ SD
20	12,00 $\pm$ 0,21	6,18 $\pm$ 0,15
40	24,00 $\pm$ 0,15	9,38 $\pm$ 0,15
60	36,15 $\pm$ 0,22	13,65 $\pm$ 0,15
80	47,98 $\pm$ 0,26	21,11 $\pm$ 0,15
100	60,00 $\pm$ 0,38	26,44 $\pm$ 0,15



Gambar 3. Kurva respons konsentrasi terhadap inhibisi DPPH (a) ekstrak etanol dan infusa; (b) vitamin C.

Tabel 4. Nilai IC_{50} ekstrak etanol, infusa, dan vitamin C berdasarkan regresi linear

Sampel	Persamaan regresi	R^2	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Vitamin C	$y = 10.3615x + 19.4688$	0.9981	2.95
Ekstrak etanol	$y = 0.5999x + 0.0325$	1.0000	83.29
Infusa	$y = 0.2612x - 0.3198$	0.9792	192.65

Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Ekstrak etanol dan infusa memperlihatkan peningkatan inhibisi DPPH seiring kenaikan konsentrasi. Pada ekstrak etanol, inhibisi meningkat dari 12,00 $\pm$ 0,21% pada 20 $\mu\text{g/mL}$ menjadi 60,00 $\pm$ 0,38% pada 100 $\mu\text{g/mL}$. Pada infusa, peningkatan terjadi dari 6,18 $\pm$ 0,15% menjadi 26,44 $\pm$ 0,15% pada rentang konsentrasi yang sama. Pola respons konsentrasi tersebut menunjukkan bahwa komponen terlarut pada kedua sediaan

mampu meredam radikal DPPH, tetapi kapasitas ekstrak etanol lebih tinggi pada setiap konsentrasi yang diuji.

Nilai IC_{50} ekstrak etanol sebesar 83,29 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah daripada infusa sebesar 192,65 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan vitamin C memberikan IC_{50} 2,95 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan klasifikasi yang digunakan dalam penelitian [24], ekstrak etanol termasuk kategori kuat, infusa termasuk kategori lemah, dan vitamin C termasuk kategori sangat kuat. Perbandingan dengan vitamin C perlu ditafsirkan secara proporsional karena vitamin C merupakan senyawa murni, sedangkan ekstrak dan infusa merupakan campuran kompleks yang mengandung senyawa aktif serta komponen nonaktif; dengan demikian, perbedaan IC_{50} tidak secara langsung menggambarkan potensi per molekul.

Aktivitas DPPH kakao tidak hanya ditentukan oleh katekin. Epikatekin, procyanidin dengan derajat polimerisasi berbeda, antosianin, asam fenolat, dan senyawa hasil pengolahan dapat berkontribusi melalui transfer atom hidrogen atau elektron. Fraksinasi procyanidin kakao yang dilakukan Toro-Uribe et al. menunjukkan bahwa aktivitas penangkapan radikal berbeda menurut komposisi dan ukuran oligomer [37]. Karena itu, konsentrasi katekin ekuivalen yang lebih tinggi pada ekstrak etanol dan IC_{50} yang lebih rendah merupakan pola yang konsisten, tetapi belum membuktikan bahwa katekin merupakan satu-satunya penyebab aktivitas antioksidan. Pembuktian hubungan tersebut memerlukan analisis komposisi menggunakan kromatografi dan pengujian korelasi pada jumlah sampel atau fraksi yang memadai.

Nilai IC_{50} ekstrak etanol diperoleh melalui interpolasi karena respons 50% tercapai di antara konsentrasi 80 dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Sebaliknya, inhibisi tertinggi infusa pada 100 $\mu\text{g/mL}$ baru mencapai 26,44%, sehingga IC_{50} 192,65 $\mu\text{g/mL}$ merupakan hasil ekstrapolasi regresi di luar rentang konsentrasi yang diuji. Nilai tersebut harus dipandang sebagai estimasi dan memiliki ketidakpastian lebih tinggi. Untuk meningkatkan ketepatan, rentang konsentrasi infusa sebaiknya diperluas hingga mencakup titik-titik di bawah dan di atas inhibisi 50%, kemudian IC_{50} dihitung menggunakan model respons konsentrasi yang sesuai.

Metode DPPH bermanfaat untuk skrining karena sederhana dan menghasilkan respons yang mudah dibandingkan, tetapi merupakan uji kimia in vitro dalam sistem pelarut tertentu. Hasilnya dipengaruhi oleh waktu inkubasi, konsentrasi DPPH, polaritas pelarut, warna intrinsik sampel, dan kemungkinan tumpang tindih absorbansi. Oleh karena itu, kapasitas antioksidan yang diperoleh tidak dapat langsung diterjemahkan menjadi efektivitas biologis. Konfirmasi menggunakan metode dengan mekanisme berbeda, seperti ABTS, FRAP, atau ORAC, disertai blanko sampel dan evaluasi sitotoksitas, akan memperkuat kesimpulan mengenai potensi antioksidan biji kakao.

Hasil Pemeriksaan makroskopik Serbuk Simplisia

Pengamatan makroskopik dilakukan dengan cara mengamati secara langsung karakteristik fisik biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Hasil dari pemeriksaan tersebut dapat dilihat pada tabel

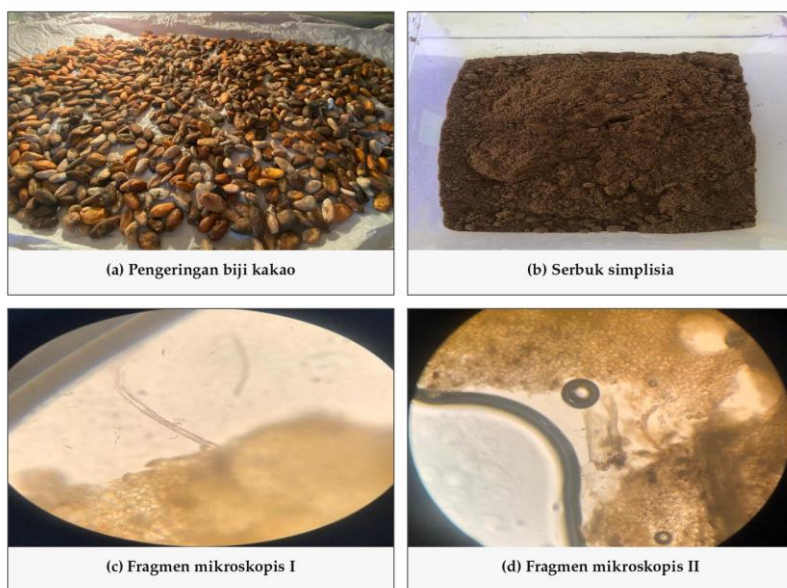
Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptik simplisia biji kakao

No	Parameter Organoleptis	Keterangan
1.	Warna	Cokelat Tua, Hampir Hitam
2.	Bentuk	Oval, Bulat Memanjang, dan Agak Lonjong
3.	Tekstur	Keras, Kering, Rapuh
4.	Aroma	Rasa Cokelat, Kacang
5.	Ukuran	Panjang 3,5 cm, Lebar 3,4 cm

Pemeriksaan makroskopis menunjukkan bahwa simplisia biji kakao berwarna cokelat tua hingga hampir hitam, berbentuk oval-lonjong, bertekstur keras, kering, dan rapuh, serta memiliki aroma khas kakao dan kacang. Ukuran biji yang diamati mencapai panjang sekitar 3,5 cm dan lebar 3,4 cm. Serbuk simplisia berwarna cokelat, sedangkan pemeriksaan mikroskopis memperlihatkan fragmen jaringan yang berasal dari bagian penyusun biji kakao.

Warna cokelat tua hingga hampir hitam pada simplisia merupakan karakter yang dapat terbentuk selama penanganan pascapanen. Pengurangan air selama pengeringan meningkatkan konsentrasi relatif komponen padat dan memfasilitasi oksidasi enzimatis polifenol, degradasi antosianin, serta pembentukan pigmen cokelat. Oleh karena itu, intensitas warna tidak hanya mencerminkan identitas bahan, tetapi juga dipengaruhi oleh suhu, laju, dan lama pengeringan. Hii et al. menunjukkan bahwa kondisi pengeringan memengaruhi warna dan mutu produk kering kakao, sedangkan Żyżelewicz et al. menjelaskan keterkaitan perubahan warna dengan oksidasi polifenol dan pembentukan pigmen selama pengolahan [30,31]. Meskipun

demikian, warna yang sangat gelap tidak dapat digunakan sebagai satu-satunya indikator mutu karena dapat pula berkaitan dengan pengeringan atau pemanasan yang berlebihan; interpretasinya perlu dipadukan dengan kadar air, aroma, dan tidak adanya tanda pertumbuhan kapang.



Gambar 4. Tahap pengolahan dan pemeriksaan mikroskopis simplisia biji kakao: (a) pengeringan biji, (b) serbuk simplisia, (c) fragmen mikroskopis I, dan (d) fragmen mikroskopis II.

Tekstur keras, kering, dan rapuh sesuai dengan berkurangnya air bebas dan air terikat selama pengeringan. Penurunan kadar air melemahkan plastisitas jaringan, menyebabkan penyusutan sel, dan meningkatkan kerapuhan sehingga biji lebih mudah dihancurkan menjadi serbuk. Karakter ini konsisten dengan kadar air simplisia sebesar $6,00 \pm 0,00\%$, yang berada pada kisaran kadar air rendah untuk penyimpanan bahan kering. Namun, tekstur rapuh tetap merupakan parameter organoleptik semikuantitatif; evaluasi kadar air diperlukan untuk memastikan bahwa kekeringan yang diamati bukan sekadar perubahan pada permukaan. Pengeringan yang terlalu cepat dapat menghasilkan gradien kelembapan antara permukaan dan bagian dalam biji, sedangkan pengeringan yang terlalu lambat meningkatkan risiko pertumbuhan kapang dan penurunan mutu [30].

Aroma kakao dan kacang yang teramati menunjukkan keberadaan komponen volatil dan prekursor cita rasa khas biji kakao. Akan tetapi, deskripsi aroma pada penelitian ini sebaiknya dipahami sebagai hasil pemeriksaan organoleptik awal dan bukan sebagai profil sensori terstandar. Fermentasi dan pengeringan mengubah kandungan asam volatil, gula pereduksi, asam amino, polifenol, dan prekursor aroma; perubahan tersebut secara bersama-sama menentukan karakter akhir biji. Warna coklat dan aroma khas yang muncul karenanya merupakan hasil interaksi kompleks antara komposisi awal bahan dan kondisi pascapanen, bukan penanda tunggal keberadaan katekin atau kapasitas antioksidan [31].

Pada tingkat mikroskopis, fragmen yang diamati dapat dikaitkan dengan jaringan tegumen dan kotiledon sebagai komponen utama biji kakao. Studi anatomi menunjukkan bahwa mesofil kotiledon tersusun atas sel penyimpanan yang kaya globula lipid, sedangkan sel polifenolik bervakuola besar tersebar pada jaringan kotiledon dan berasosiasi dengan berkas vaskular. Martini et al. melaporkan adanya sel polifenolik yang tersebar di antara sel parenkim kotiledon pada berbagai spesies *Theobroma*, sementara Cerri et al. mengonfirmasi bahwa bagian tegumen, kotiledon, dan sumbu embrio memiliki pola penyimpanan metabolit yang berbeda [32,33]. Dengan demikian, fragmen pada Gambar 4 mendukung identitas anatomis simplisia biji kakao, tetapi penetapan fragmen diagnostik secara definitif tetap memerlukan pembesaran, pewarnaan, dan dokumentasi skala yang lebih terstandar.

Secara keseluruhan, kesesuaian antara karakter makroskopis, kadar air, dan gambaran mikroskopis memperkuat autentikasi awal simplisia sebelum ekstraksi. Pemeriksaan tersebut penting karena variasi ukuran biji, intensitas warna, dan struktur jaringan dapat dipengaruhi oleh genotipe, kematangan, fermentasi, serta kondisi pengeringan. Oleh sebab itu, hasil morfologi pada penelitian ini paling tepat diposisikan sebagai data karakterisasi sampel spesifik yang melengkapi parameter mutu fisikokimia, bukan sebagai standar universal untuk seluruh biji *Theobroma cacao* L. [30,33].

Hasil karakterisasi simplisia biji kakao

Meliputi pengujian kadar air, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut dalam asam. Pengujian ini bertujuan untuk menilai mutu awal simplisia sebagai bahan baku obat tradisional maupun produk berbasis bahan alam.

Kadar air merupakan parameter penting untuk menilai stabilitas simplisia terhadap pertumbuhan mikroorganisme. Hasil pemeriksaan menunjukkan kadar air masih berada dalam batas yang diizinkan, menandakan bahwa simplisia memiliki tingkat kekeringan yang memadai untuk penyimpanan jangka menengah hingga panjang. Selanjutnya, pemeriksaan terhadap kadar sari larut air digunakan untuk mengukur sejauh mana komponen aktif dapat terekstraksi dalam pelarut air. Nilai yang diperoleh mencerminkan potensi simplisia untuk aplikasi dalam bentuk sediaan seperti rebusan. Sementara itu, kadar abu total menggambarkan jumlah total residu anorganik yang tertinggal setelah proses pembakaran, yang menjadi indikator kemurnian bahan.

Kadar abu yang tinggi dapat mengindikasikan kontaminasi tanah atau material anorganik lainnya selama proses pengeringan atau penyimpanan.

Kadar sari larut etanol yang dimana parameter yang menunjukkan persentase kandungan senyawa aktif dalam simplisia yang dapat larut dalam pelarut etanol. Etanol digunakan karena kemampuannya mengekstraksi senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran yang bervariasi, mulai dari polar, semi-polar, hingga sebagian senyawa non-polar. Oleh karena itu, kadar sari larut etanol mencerminkan jumlah total senyawa aktif dengan berbagai sifat kepolaran yang terkandung dalam bahan simplisia.

Kadar abu total yaitu persentase massa residu yang tertinggal setelah seluruh komponen organik dalam suatu sampel dihilangkan melalui proses pembakaran pada suhu tinggi. Residu ini terdiri atas berbagai senyawa anorganik dan mineral yang secara alami terdapat dalam bahan tersebut. Penentuan kadar abu total termasuk dalam analisis proksimat, yang berfungsi untuk menilai kandungan gizi suatu produk pangan, khususnya dalam mengestimasi jumlah total mineral yang terkandung di dalamnya. Adapun kadar abu tidak larut dalam asam menunjukkan fraksi dari abu total yang tidak larut dalam larutan asam encer, yang mencerminkan adanya kontaminan seperti silika dari tanah atau pasir. Nilai ini penting untuk memastikan bahwa simplisia bebas dari pencemaran mineral anorganik yang bersifat inert.

Secara umum, hasil uji karakterisasi simplisia biji kakao menunjukkan kualitas yang sesuai dengan parameter standar mutu simplisia. Data hasil pengujian disajikan dalam Tabel berikut:

Tabel 6. Karakteristik simplisia biji kakao (rerata $\pm$ SD)

Parameter	Rerata $\pm$ SD (%)	n	Persyaratan MMI (%)	Interpretasi
Kadar air	6,00 $\pm$ 0,00	3	≤ 10	Memenuhi
Sari larut air	11,63 $\pm$ 3,67	3	≥ 7	Memenuhi
Sari larut etanol	9,77 $\pm$ 0,95	3	$\geq 3,5$	Memenuhi
Abu total	3,80 $\pm$ 0,25	3	≤ 8	Memenuhi
Abu tidak larut asam	0,73 $\pm$ 0,03	3	≤ 1	Memenuhi

Hasil pemeriksaan karakterisasi simplisia biji kakao menunjukkan bahwa bahan baku memenuhi seluruh persyaratan *Materia Medika Indonesia* (MMI), yang menjadi landasan penting bagi mutu dan efisiensi ekstraksi: Kadar Air (6,6%): Berada di bawah batas maksimum (10%), menandakan stabilitas penyimpanan yang baik serta meminimalkan risiko degradasi enzimatis atau pertumbuhan mikroorganisme sebelum proses ekstraksi. Kadar Sari Larut Air (11,5): Nilai kadar sari larut air yang tergolong tinggi (11,5%, di atas standar MMI $\geq 7\%$) mengindikasikan tingginya potensi kandungan senyawa-senyawa hidrofilik atau polar di dalam jaringan biji kakao. Potensi ini kemudian terkonfirmasi melalui kemampuan bentuk sediaan infusa dalam menunjukkan aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal bebas DPPH. Kadar Sari Larut Etanol (9,7%): Nilai ini jauh melampaui batas minimal MMI ($\geq 3,5\%$), menegaskan keberadaan konstituen aktif bersifat semi-polar hingga non-polar (seperti golongan flavonoid, katekin, dan alkaloid) yang melimpah dan siap terekstraksi oleh pelarut organik.

Hasil pemeriksaan karakterisasi penetapan kadar sari larut dalam air pada simplisia biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diperoleh hasil 6% sehingga dikatakan memenuhi syarat dari persyaratan *Materia Medika Indonesia* (MMI) yaitu lebih dari 3,5%. Tujuan yaitu untuk mengetahui seberapa banyak senyawa atau zat aktif dari suatu simplisia (bahan alam seperti tanaman obat) yang dapat larut dalam air, yang merupakan pelarut polar [25]. Uji kualitatif yang dilakukan pada biji kakao yang bertujuan untuk

mengidentifikasi jenis zat atau komponen yang terkandung didalam sampel melalui skrining fitokimia. Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 7. Rendemen ekstrak etanol biji kakao

Berat Ekstrak	Berat simplisia	% Randemen
202,322 gram	500 gram	40,4644 %

Uji skrining fenolik dengan FeCl_3 1 % memberikan hasil positif (+), sesuai dengan standar metode fitokimia dalam studi tumbuhan [26].

Hasil Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan bertujuan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terdapat dalam simplisia serbuk dan ekstrak dari biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Terdiri dari polifenol, flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, triterpenoid/steroid, dan glikosida. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 8. Hasil skrining fitokimia serbuk simplisia dan ekstrak etanol biji kakao

No	Pemeriksaan	Hasil serbuk Simplisia	Hasil Ekstrak
1.	Polifenol	(+)	(+)
2.	Flavonoid	(+)	(+)
3.	Alkaloid	(+)	(+)
4.	Tanin	(+)	(+)
5.	Saponin	(+)	(+)
6.	Triterpenoid/Steroid	(+)	(+)
7.	Glikosida	(+)	(+)

Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa serbuk simplisia dan ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menunjukkan hasil positif terhadap kandungan metabolit sekunder yaitu polifenol, flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, triterpenoid/steroid, dan glikosida. Dalam pengujian serbuk dan ekstrak bahwa sampel biji kakao hasil positif mengandung senyawa polifenol pada serbuk yaitu berwarna hijau kehitaman sedangkan ekstrak menunjukkan hasil positif biru kehitaman. Dapat dilihat dari perubahan warna yang terjadi pada saat penambahan larutan FeCl_3 1% larutan ini bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa fenol. Pereaksi FeCl_3 digunakan secara luas untuk mengidentifikasi senyawa fenol [27]

Hasil Pengukuran Absorbansi Antioksidan Ekstrak Etanol, Infusa Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) dan Vitamin C Terhadap Radikal Bebas DPPH

Aktivitas antioksidan meningkat seiring kenaikan konsentrasi. Pada 100 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak etanol menghasilkan inhibisi $60,00 \pm 0,38\%$, sedangkan infusa $26,44 \pm 0,15\%$. Berdasarkan regresi linear, IC_{50} ekstrak etanol dan infusa berturut-turut adalah 83.29 dan 192.65 $\mu\text{g/mL}$; vitamin C memberikan IC_{50} 2.95 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan tersebut menunjukkan respons antioksidan ekstrak etanol yang lebih tinggi pada kondisi pengujian, tanpa menegaskan hubungan kausal dengan satu senyawa tertentu.

Meskipun hasil kualitatif menunjukkan bahwa kedua metode dapat mengekstraksi seluruh golongan metabolit sekunder, etanol 70% terbukti sebagai pelarut yang lebih superior dibanding air panas. Kemampuan etanol 70% dalam mengekstraksi senyawa fenolik dan katekin dalam jumlah (kadar) yang lebih tinggi secara langsung berkorelasi dengan efektivitas donor elektron yang lebih kuat dalam menetralkan radikal bebas DPPH. Hasil pengujian menunjukkan bahwa baik ekstrak etanol maupun infusa biji kakao menyebabkan penurunan nilai absorbansi larutan DPPH, yang mencerminkan aktivitas peredaman radikal bebas. Penurunan absorbansi meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi sampel, menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi dan aktivitas antioksidan. Setiap sampel menghasilkan nilai inhibisi yang berbeda, mencerminkan variasi efektivitas dalam menangkap radikal bebas [28]

Fenomena penurunan absorbansi ini terjadi karena adanya kemampuan senyawa aktif, seperti katekin dalam ekstrak etanol biji kakao, untuk mendonorkan elektron dan menstabilkan radikal DPPH yang bersifat tidak stabil. Proses ini menghasilkan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning pucat, yang sejalan dengan berkurangnya nilai absorbansi. Semakin tinggi konsentrasi senyawa antioksidan, semakin efektif pula penangkapan radikal bebas yang terjadi selama reaksi [29].

Kesimpulan

Ekstrak etanol biji kakao mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, triterpenoid/steroid, dan glikosida. Pada kondisi pengujian, konsentrasi katekin ekuivalen dalam larutan ukur ekstrak etanol ($37,15 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) lebih tinggi daripada infusa ($19,83 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$). Ekstrak etanol juga menunjukkan aktivitas antioksidan DPPH lebih kuat dengan IC_{50} 83,29 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan IC_{50} infusa sebesar 192,65 $\mu\text{g/mL}$ merupakan estimasi hasil ekstrapolasi; vitamin C memiliki IC_{50} 2,95 $\mu\text{g/mL}$. Karena pengukuran UV-Vis langsung pada 280 nm tidak memisahkan katekin dari senyawa penyerap UV lainnya, hasil dinyatakan sebagai katekin ekuivalen dan memerlukan konfirmasi menggunakan HPLC-DAD atau LC-MS. Secara keseluruhan, pendekatan penyarian berpengaruh terhadap respons katekin ekuivalen dan kapasitas antioksidan, dengan ekstrak etanol memberikan hasil lebih tinggi daripada infusa pada kondisi penelitian ini.

Konflik Kepentingan

Seluruh penulis menyatakan tidak memiliki konflik kepentingan dalam bentuk apa pun, baik finansial maupun nonfinansial, yang dapat memengaruhi pelaksanaan penelitian, hasil yang diperoleh, maupun interpretasi terhadap temuan yang disajikan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Muslim Nusantara atas dukungan fasilitas, bantuan institusional, serta berbagai kontribusi yang diberikan selama seluruh proses penelitian berlangsung.

Referensi

- [1] Ifmalinda I, Saputra E, Cherie D. Pengaruh suhu pengeringan terhadap mutu kakao (*Theobroma cacao* L.) varietas klon BL 50 pasca fermentasi. Teknotan J Ind Teknol Pertanian 2023;17:105–14.
- [2] Krisyanti A, Goo EEK, Botu PSL, Damayanti MFD, Rosadalima M, Anjelo M. Analisis Strategi Pengembangan Industri Coklat Lokal COSIK Berbasis Kakao Kabupaten Sikka. J Pelayanan Masy 2025;2:301–11.
- [3] Muhtar NI. Review Artikel: Pemanfaatan Senyawa Katekin sebagai Bahan Baku Sediaan Farmasi. J Teknol Dan Sains Mod 2026;3:29–36.
- [4] Fadhillah ZH, Perdana F, Syamsudin RAMR. Telaah kandungan senyawa katekin dan Epigallocatekin Galat (EGCG) sebagai antioksidan pada berbagai jenis teh. J Pharmascience 2021;8:31–44.
- [5] Utami RR. Antioksidan biji kakao: Pengaruh fermentasi dan penyangraian terhadap perubahannya (ulasan). J Ind Has Perkeb 2018;13:75–85.
- [6] Niswah FS, Yasa IWS, Nofrida R. Pengaruh suhu dan lama penyangraian biji kakao terhadap karakteristik mutu teh kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). J Edukasi Pangan 2025;3:58–71.
- [7] Wicaksana AP. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil) 2022.
- [8] Othman A, Jalil AMM, Weng KK, Ismail A, Abd Ghani N, Adenan I. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. African J Biotechnol 2010;9:1052. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1219>.
- [9] Emelda A. Polyphenol total content, IC_{50} and antioxidant activities of ethanol extract from some cocoa (*Theobroma cacao*) beans in South Sulawesi Indonesia. J Chem Pharm Res 2015;7:1211–4.
- [10] Sutjiati R, Devi LS, Prijatmoko D, Joelialjanto R, Sulistyani E, Safitri BP, et al. Bioactive potential of edel cocoa bean (*Theobroma cacao* L) from Kedaton Jember: Cytotoxicity and antioxidants evaluation. J Dentomaxillofacial Sci 2022;7. <https://doi.org/10.15562/jdmfs.v7i1.1068>.
- [11] Indarto R, Pranoto Y, Santoso U. In vitro Antioxidant Activity and Profile of Polyphenol Compounds Extracts and their Fractions on Cacao Beans. Pak J Biol Sci 2019;22:34–44.
- [12] Harahap SN, Situmorang N. Skrining fitokimia dari senyawa metabolit sekunder buah jambu biji merah (*Psidium guajava* L.). EduMatSains J Pendidikan, Mat Dan Sains 2021;5:153–64.
- [13] Butar-Butar RGS, Neswita E, Sembiring NB, Novriani E, Simanjuntak NJP, Pakpahan EH. Uji skrining fitokimia dan pengukuran kadar total flavonoid pada ekstrak paku (*Nephrolepis biserrata*) dengan fraksi n-

heksana, etil asetat, dan air. J Pharm Sci 2023;1142–60.

- [14] Natasya E, Daulay AS, Ridwanto R, Rahayu YP. Determination of total flavonoid content of wood extract raru (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) based on differences in ethanol concentration with Uv-Vis spectrophotometry methods. J Pharm Sci 2023;6:1804–1810. <https://doi.org/https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v6i4.305>.
- [15] Ruso S, Pirman P. the Processing and Analysis of the Polyphenols Content of Cocoa Bean (*Theobroma Cocoa* L) and the Development As Functional Foods. Semin. Nas. Has. Penelit. Pengabd. Kpd. Masy., vol. 3, 2018.
- [16] Syiaulhaq S. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Asal Kabupaten Bulukumba Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Tikus (*Rattus norvegicus*): Kata Kunci: Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.); Gula darah; Tikus putih (*Rattus norvegicus*); Glukometer. J Novem Med Farm 2023;2:1–10.
- [17] Ridwanto R, Rosa VD, Rani Z, Fauzi ZPA. Utilization of chitosan from fresh water lobster (*Cherax quadricarinatus*) shells in anti-acne gel preparations. Trends Sci 2024;21:7243.
- [18] Handayani S, Najib, A., Wisdawati, W., & Khoiriyah A. Aktivitas Antioksidan *Caulerpa lentillifera* J. Agardh Dengan Metode Peredaman Radikal Bebas 1, 1-diphenyl-2 picrylhydrazil. J Kesehat 2020;13:61–70.
- [19] Ri D. *Materia Medika Indonesia*. Jakarta: Dapartemen Kesehatan Ri.; 1995.
- [20] Pom D. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. . Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Vii; 1985.
- [21] Azah NI, Muchtarichie R, Iskandar Y. Standardization Parameters For Cocoa Pods (*Theobroma cacao* L.). J Ilm Farm 2020;16:182–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.20885/Jif.Vol16.Iss2>.
- [22] Arsyad R, Amin A, Waris R. Teknik Pembuatan Dan Nilai Rendamen Simplisia Dan Ekstrak Etanol Biji Bagore (*Caesalpinia Crista* L.) Asal Polewali Mandar. Makassar Nat Prod J 2023;1:2023–2138.
- [23] Daulay, S A. Karakterisasi Dan Uji Intensitas Warna Kuning Pada Ekstrak Campuran Kunyit-Daun Salam Yang Berpotensi Sebagai Pewarna Pangan Universal. 2014:4171–3.
- [24] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004;26:211–9.
- [25] Devitria R. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Ciplukan menggunakan Metode 2, 2-Diphenyl 1-Picrylhydrazyl (DPPH). J Penelit Farm Indones 2020;9:31–6.
- [26] Dewi. Optimasi Perbandingan Pelarut Etanol Air Terhadap Kadar Tanin Pada Daun Matoa (*Pometia Pinnata* J.R & G. Forst) Secara Spektrofotometri. Chim Nat Acta 2021;9:102–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.24198/Cna.V9.N3.36768>.
- [27] Fitriana YAN, Fitri AS. Analisis kadar vitamin c pada buah jeruk menggunakan metode titrasi iodometri. Sainteks 2020;17:27–32.
- [28] HM N, R Y, Z R, A N. Phytochemical screening and antibacterial activity test of ethanol extract of jengkol leaves (*Archidendron pauciflorum* Benth.) IC Nielsen against *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. Int J Sci Technol Manag 2020.
- [29] Fitria Novika Sari YS. Uji Aktivitas Antioksidan Pada Limbah Kulit Buah-Buahan Khas Indonesia. J Anal Farm 2023;8:123–131.
- [30] Hii CL, Law CL, Cloke M, Suzannah S. Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. Biosystems Engineering. 2009;102(2):153–161. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.10.007>.
- [31] Żyżelewicz D, Krysiak W, Nebesny E, Budryn G. Application of various methods for determination of the color of cocoa beans roasted under variable process parameters. European Food Research and Technology. 2014;238:549–563. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2123-6>.
- [32] Martini MH, Figueira A, Lenci CG, Tavares DQ. Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). Brazilian Journal of Botany. 2008;31(3):425–431. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042008000300006>.
- [33] Cerri M, Reale L, Zadra C. Metabolite storage in *Theobroma cacao* L. seed: cyto-histological and phytochemical analyses. Frontiers in Plant Science. 2019;10:1599. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01599>.
- [34] Gottumukkala RVSS, Nadimpalli N, Sukala K, Subbaraju GV. Determination of catechin and epicatechin content in chocolates by high-performance liquid chromatography. International Scholarly Research Notices. 2014;2014:628196. <https://doi.org/10.1155/2014/628196>.
- [35] Othman A, Ismail A, Ghani NA, Adenan I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chemistry. 2007;100(4):1523–1530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.021>.
- [36] Payne MJ, Hurst WJ, Miller KB, Rank C, Stuart DA. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010;58(19):10518–10527. <https://doi.org/10.1021/jf102391q>.
- [37] Toro-Urbe S, Herrero M, Decker EA, López-Giraldo LJ, Ibáñez E. Preparative separation of procyanidins from cocoa polyphenolic extract: comparative study of different fractionation techniques. Molecules. 2020;25(12):2842. <https://doi.org/10.3390/molecules25122842>.