



The determination of total flavonoid content of ethanol extract of ethyl acetate and n-hexane fractions in cocoa (*Theobroma cacao L.*) leaves using uv-vis spectrophotometry method

Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan n-heksan pada daun kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan metode spektrofotometri uv-vis

Zikra Maqfirah¹, Muhammad Amin Nasution^{1*}, M. Pandapotan Nasution¹, Haris Munandar Nasution¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah, Medan, Sumatera Utara, Indonesia.

* e-mail author : Muhammadaminnst1@gmail.com

ABSTRACT

*Cocoa (*Theobroma cacao L.*) is a plant that is cultivated on plantations in Indonesia. One part of the cacao plant that has the potential to be developed as a traditional medicine is the cacao leaf because it contains secondary metabolites of flavonoids. Flavonoids have many properties, including acting as antioxidants, protecting cell structures, anti-inflammatories, preventing osteophoresis, and antibiotics. The purpose of this study is to determine the content of secondary metabolites and total flavonoid levels in ethanol extract, ethyl acetate fraction and n-hexane in cocoa leaves. In this study, the initial steps taken are sample collection, sample processing into simplicia, simplicia characterization test then preparation of cocoa leaf ethanol extract by maceration method using 70% ethanol solvent, followed by partitioning process with liquid-liquid extraction method to obtain ethyl acetate fraction and n-hexane and phytochemical screening is carried out. Determination of total flavonoid levels using the UV-vis spectrophotometric method at a wavelength of 437 nm with quercetin as a comparison. The results of this study showed that a cocoa leaf ethanol extract contains alkaloid compounds, flavonoids, tannins, saponins, steroids and glycosides, the ethyl acetate fraction contains alkaloid compounds, flavonoids, tannins, steroids and glycosides, while the n-hexane fraction contains alkaloid compounds, flavonoids and steroids. Total flavonoid levels in cocoa leaves from an ethanol extract amounted to 39.1422 ± 0.0540 mg QE/g, ethyl acetate fraction 45.274 ± 0.0629 mg QE/g and n-hexane fraction 21.4812 ± 0.7048 mg QE/g. The highest flavonoid levels are obtained in the ethyl acetate fraction.*

Keywords: Cocoa leaves, fractions, spectrophotometry, flavonoids.

ABSTRAK

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan tumbuhan yang dibudidayakan dalam bentuk perkebunan di Indonesia. Salah satu bagian dari tumbuhan kakao yang bisa berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan obat tradisional adalah daun kakao karena mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid. Flavonoid mempunyai banyak khasiat, diantaranya yaitu sebagai antioksidan, melindungi struktur sel, antiinflamasi, mencegah osteoforesis, dan sebagai antibiotik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan n-heksan pada daun kakao.

Pada penelitian ini, langkah awal yang dilakukan adalah pengumpulan sampel, pengolahan sampel menjadi simplisia, uji karakterisasi simplisia kemudian pembuatan ekstrak etanol daun kakao dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, dilanjutkan dengan proses partisi dengan metode ekstraksi cair-cair sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan n-heksan dan dilakukan skrining fitokimia. Penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode spektrofotometri uv-vis pada panjang gelombang 437 nm dengan pembanding kuersetin. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kakao mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan glikosida, pada fraksi etil asetat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, steroid dan glikosida, sedangkan pada fraksi n-heksan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan steroid. Kadar flavonoid total pada daun kakao dari ekstrak etanol sebesar $39,1422 \pm 0,0540$ mg QE/g, fraksi etil asetat $45,274 \pm 0,0629$ mg QE/g dan fraksi n-heksan $21,4812 \pm 0,7048$ mg QE/g. Kadar flavonoid tertinggi di peroleh pada fraksi etil asetat.

Kata Kunci: Daun kakao; fraksi; spektrofotometri; flavonoid

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman jenis tumbuhan yang termasuk di dalamnya tumbuhan kakao. Kakao merupakan salah satu jenis tanaman yang ditanam dalam skala perkebunan di Indonesia. Berbagai bagian dari tanaman kakao memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan obat tradisional, seperti daunnya yang mengandung senyawa metabolit sekunder, termasuk flavonoid (Mandhaki dkk, 2021). Senyawa metabolit sekunder memegang peran penting dalam menentukan dampak yang dimiliki oleh tanaman terhadap kesehatan (Septiana, dkk.,2023).

Flavonoid adalah salah satu kelompok senyawa fenol alami yang paling luas tersebar dan dapat ditemukan hampir di seluruh tanaman hijau. Flavonoid memiliki berbagai manfaat, termasuk sebagai agen antioksidan yang melindungi struktur sel, memiliki sifat antiinflamasi, mencegah osteoporosis, dan berperan sebagai antibiotik (Suhaenah., dkk, 2021).

Daun kakao mengandung senyawa bioaktif, seperti senyawa fenolat dan flavonoid, yang memiliki peran sebagai antioksidan. Menurut penelitian Osman dkk. (2004) Daun kakao mengandung polifenol yang terdiri dari senyawa seperti gallic acid (GA), epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), dan epicatechin (EC). Jumlah masing-masing senyawa ini dipengaruhi oleh usia daun. Pada daun muda kakao, terdapat 2,24% kafein, 19,0% total polifenol, dan 9,75% total

katekin dari total polifenol. Sedangkan pada daun yang lebih tua, terdapat 1,33% kafein, 28,4% total polifenol, dan 5,25% total katekin dari total polifenol.

Daun kakao teridentifikasi mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan saponin (Parbuntari, dkk, 2018). Menurut Ulfah, dkk (2022), hasil dari analisis fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari daun kakao mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder, termasuk alkaloid, flavonoid, saponin, dan fenolik. Hasil penelitian juga mengungkap bahwa ekstrak etanol daun kakao memiliki kandungan flavonoid total sebanyak $9,777 \pm 0,170$ mg RE/gr. Penelitian lain yang dilakukan oleh Hasanah dan rekan-rekannya pada tahun 2017 mengungkapkan bahwa fraksi etil asetat dan N-heksan dari daun kakao mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, fenolik, dan flavonoid, dengan fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi dengan nilai IC50 sebesar 41,76 ppm. Senyawa golongan fenol dan flavonoid memainkan peran penting dalam aktivitas antioksidan, di mana semakin tinggi aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan fenol dan flavonoid dalam ekstrak tersebut.

Kandungan flavonoid dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol yang memiliki sifat polar, sehingga flavonoid akan terlarut dalam pelarut ini (Bangun, dkk, 2021). Selain itu, proses fraksinasi juga dapat diterapkan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder. Fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa dengan menggunakan dua pelarut yang berbeda

berdasarkan tingkat polaritasnya. Tujuan dari proses fraksinasi adalah untuk memperoleh fraksi ekstrak yang lebih murni dengan aktivitas yang lebih tinggi (Suhaenah.,dkk, 2021).

Pengukuran jumlah flavonoid secara kuantitatif dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metode ini memanfaatkan serapan cahaya ultraviolet dan cahaya tampak pada spektrum yang disebabkan oleh struktur flavonoid. Hal ini sangat berguna karena flavonoid memiliki sistem aromatik yang terkonjugasi, sehingga dapat menunjukkan serapan cahaya yang kuat pada daerah UV-Vis (Mukhriani.,dkk, 2015).

Berdasarkan penjelasan di atas dan temuan dari penelitian sebelumnya, terdapat indikasi bahwa daun kakao mengandung flavonoid ketika diekstraksi menggunakan pelarut etanol. Namun, belum ada penelitian yang mencoba mengeksplorasi kandungan flavonoid dalam daun kakao ketika diekstraksi dengan pelarut berkepolaran berbeda. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk melakukan penelitian guna menentukan kadar total flavonoid dalam ekstrak etanol serta dalam fraksi etil asetat dan fraksi N-heksan dari daun kakao (*Theobroma cacao L.*) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Penelitian ini diharapkan dapat membuka peluang untuk mengembangkan potensi tanaman ini sebagai bahan baku obat dengan lebih optimal.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder apa saja yang terdapat pada simplisia ekstrak etanol fraksi etil asetat dan n-Heksan daun kakao dan untuk mengetahui perbedaan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol fraksi etil asetat dan fraksi N-heksan daun kakao.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara (UMN) Al-Washliyah Medan. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember sampai Mei 2023.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu blender, botol berwarna gelap, *rotary evaporator*, alas bulat, corong pisah, kapas, tisu, aluminium foil, timbangan analitik, pipet tetes, batang pengaduk, corong, gelas ukur,

erlenmeyer, beaker glass, tabung reaksi, labu ukur, cawan penguap, krus porselin, *hot plate*, dan seperangkat alat spektrofotometri UV-Vis.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi : Daun Kakao, etanol 70%,etil asetat, N-heksan, metanol, asam asetat anhidrida, asam nitrat, asam sulfat, amil alkohol, besi (III) klorida, bismut (III) nitrat, iodium, kalium iodida, serbuk magnesium, raksa (II) klorida, alfa-naftol, timbal (II) asetat, toluene, kloroform, aquadest, asam klorida, kuersetin, aluminium klorida, dan natrium asetat.

Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kakao yang diperoleh dari Desa Pantee Limeng Kecamatan Bandar Baru, Kabupaten Pidie Jaya, Aceh.

Pengolahan Simplisia

Sampel daun kakao (*Theobroma cacao L.*) yang masih segar dikumpulkan, kemudian disortasi dalam kondisi basah untuk memisahkan cecair seperti kotoran dan bahan asing lain dari bahan simplisia. Setelah itu, sampel tersebut ditimbang dalam keadaan basah. Selanjutnya, sampel dikeringkan dengan menggunakan lemari pengering hingga benar-benar kering, dan dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan benda-benda asing yang mungkin masih tertinggal pada simplisia tersebut. Setelah proses ini selesai, sampel ditimbang dalam keadaan kering, dihaluskan, dan kemudian ditimbang kembali. Tujuan dari pembuatan serbuk halus ini adalah untuk meningkatkan efisiensi proses ekstraksi, karena semakin kecil ukuran serbuk, semakin besar luas permukaannya. Hal ini akan meningkatkan interaksi antara sampel dan pelarut, sehingga ekstraksi dapat dilakukan dengan lebih efektif (Fitri, dkk., 2023).

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kakao

Ekstrak daun kakao (*Theobroma cacao L.*) dibuat menggunakan metode maserasi. Awalnya, 500 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan 3750 ml pelarut etanol 70%. Campuran ini dibiarkan selama 5 hari, dijaga agar terlindung dari cahaya, dan sesekali diaduk. Setelah itu, campuran tersebut diperas untuk menghasilkan maserat I.

Kemudian, ampas yang tersisa dicuci dengan 1250 ml pelarut etanol 70%. Maserat I dan maserat II kemudian digabungkan dalam wadah tertutup dan dibiarkan selama 2 hari di tempat yang sejuk dan terlindung dari sinar matahari. Setelah periode ini, campuran tersebut disaring atau diendapkan sehingga diperoleh hasil maserat. Selanjutnya, maserat ini dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator dengan menjaga suhu di bawah 50 °C hingga menghasilkan ekstrak kental (Depkes Ri, 1979).

Pembuatan Fraksi

Ekstraksi cair-cair dilakukan secara berurutan dengan menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat. Awalnya, 40 gram ekstrak etanol dilarutkan dalam 100 ml etanol 70%, lalu ditambahkan 100 ml air destilasi. Campuran ini kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, diikuti dengan penambahan larutan n-heksana sebanyak 200 ml. Setelah digojok dan didiamkan hingga sempurna terpisah, fase n-heksana akan berada di bagian atas dan fase etanol-air di bagian bawah, lalu dipisahkan. Fase etanol-air tersebut kemudian diekstraksi kembali dengan n-heksana dalam beberapa tahap pengulangan. Selanjutnya, fase etanol-air di tambahkan etil asetat sebanyak 200 ml, digojok, dan didiamkan hingga sempurna terpisah. Fase etil asetat akan berada di bagian atas dan fase etanol-air di bagian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-air juga diekstraksi kembali dengan etil asetat dalam beberapa tahap pengulangan. Larutan n-heksana dan larutan etil asetat yang dihasilkan selanjutnya dipekatkan hingga membentuk fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat (Sarker et al., 2006).

Karakteristik Simplisia

Dalam penelitian ini, digunakan serbuk yang berasal dari simplisia daun kakao sebagai objek pemeriksaan. Karakteristik dari simplisia ini mencakup pengujian makroskopik, mikroskopik, penentuan kadar air, penentuan kadar sari larut dalam air, penentuan kadar sari larut dalam etanol, analisis abu total, dan analisis abu yang tidak larut dalam asam.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa yang terdapat dalam daun kakao mencakup pengujian terhadap alkaloid,

flavonoid, tannin, saponin, steroid/triterpenoid, dan glikosida.

Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Sebanyak 0,4 ml dari larutan standar baku II (LIB II) dengan konsentrasi 4 µg/ml dipipet ke dalam labu tentukur berukuran 10 ml. Selanjutnya, ditambahkan 0,1 ml AICI₃ 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan 2,8 ml air destilasi. Kemudian, ditambahkan metanol hingga mencapai tanda batas pada labu, lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya, serapan cahaya pada panjang gelombang maksimum 400-800 nm diukur. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum untuk kuersetin adalah pada 437 nm (Aminah *et al*, 2017).

Pengukuran Operating Time

Sebanyak 0,4 ml dari larutan standar baku II (LIB II) dengan konsentrasi 4 µg/ml dipipet ke dalam labu tentukur berukuran 10 ml. Selanjutnya, ditambahkan 0,1 ml AICI₃ 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan 2,8 ml air destilasi. Kemudian, metanol ditambahkan hingga mencapai tanda batas pada labu. Setelah itu, serapan cahaya kuersetin diukur selama 60 menit pada panjang gelombang 437 nm.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Kuersetin

Dalam prosedur ini, sebanyak 25 mg kuersetin ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 25 ml. Kemudian, metanol ditambahkan hingga mencapai tanda batas, sehingga menghasilkan larutan baku I (C= 1000 µg/ml). Selanjutnya, diambil 5 ml dari larutan baku I dan dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 50 ml, yang kemudian dicukupkan dengan metanol hingga tanda batas, menghasilkan larutan baku II (C= 100 µg/ml). Selanjutnya, dilakukan pembuatan seri kadar dengan mengambil beberapa volume dari larutan baku II, yaitu 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, dan 0,6 ml, yang memiliki konsentrasi masing-masing 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, dan 6 µg/ml. Setiap sampel ditambahkan 1,5 ml metanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan 2,8 ml air destilasi. Kemudian, metanol ditambahkan hingga mencapai garis tanda pada labu, dan campuran dihomogenkan serta didiamkan selama 6-9 menit. Selanjutnya,

serapan cahaya pada panjang gelombang maksimum 437 nm diukur (Aminah *et al*, 2017).

Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Etanol, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi N-heksan Daun Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat serta fraksi n-heksan dari daun kakao (*Theobroma cacao L.*) masing-masing sebanyak 25 mg ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 25 ml. Selanjutnya, metanol ditambahkan hingga mencapai tanda batas, sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi $C = 1000 \mu\text{g/ml}$. Kemudian, diambil 1 ml dari larutan ini dan dimasukkan ke dalam labu tentukur berukuran 10 ml. Selanjutnya, ke dalam labu ini ditambahkan 1,5 ml metanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan 2,8 ml air destilasi. Larutan ini kemudian dicukupkan dengan metanol hingga mencapai garis tanda pada labu. Campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 6-9 menit. Selanjutnya, serapan cahaya pada panjang gelombang maksimum 437 nm diukur. Setiap analisis dilakukan dalam enam replikasi, dan nilai rata-rata absorbansi diperoleh dari hasil tersebut (Aminah *et al*, 2017).

Perhitungan Kadar Flavonoid

Konsentrasi total flavonoid dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, serta fraksi n-heksan dari daun kakao, dapat dihitung dengan menggunakan nilai absorbansi sampel. Ini dilakukan melalui persamaan garis regresi linear yang dibuat berdasarkan konsentrasi kuersetin sebagai standar :

$$y = a + bx$$

Nilai absorbansi sampel yang didapat didistribusikan lagi kedalam rumus perhitungan sebagai berikut (Winahyu dkk., 2019).

$$\text{Kadar } (\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V \times F_p}{W}$$

HASIL DAN DISKUSI

Ekstraksi adalah langkah kunci dalam proses analisis sampel, dengan tujuan utama yaitu menglarutkan semua komponen yang ada dalam sampel dengan pelarut yang sesuai. Selain itu, ekstraksi juga bertujuan untuk menjaga integritas senyawa metabolit yang ada dalam

sampel sehingga tidak mengalami kerusakan selama proses ekstraksi. Penggunaan metode ekstraksi maserasi memiliki kelebihan tertentu. Metode ini dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut, sehingga serbuk simplisia tersebut terserap oleh pelarut dengan baik. Proses perendaman ini juga memungkinkan komposisi sel dalam serbuk simplisia menjadi lebih lembut. Akibatnya, senyawa-senyawa yang biasanya sulit larut dapat lebih mudah terlarut dalam pelarut yang digunakan. Selain itu, proses remaserasi digunakan untuk mencegah pelarut menjadi jenuh dengan senyawa yang telah terlarut. Dengan demikian, proses ekstraksi dapat berlanjut dengan efisien, dan senyawa yang diinginkan dapat terlarut kembali dalam pelarut. Pemilihan pelarut etanol 70% dalam metode ekstraksi ini didasarkan pada sifatnya sebagai pelarut organik universal yang aman. Etanol 70% mampu mengekstrak senyawa polar, semi-polar, maupun non-polar dengan baik. Keamanan etanol sebagai pelarut juga penting, karena tingkat toksisitasnya rendah jika terjadi kontaminasi dalam sampel, sehingga etanol 70% merupakan pilihan yang ideal dalam proses ekstraksi ini (Andry, dkk., 2023). Selain itu alasan penggunaan etanol 70% sebagai pelarut juga disebabkan oleh kemampuannya untuk mengekstrak lebih banyak senyawa aktif dibandingkan dengan pelarut organik lainnya. Selain itu, etanol tidak bersifat beracun jika dikonsumsi karena memiliki tingkat toksisitas yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut lainnya (Faisal,H., dkk. 2023). Metode maserasi adalah sebuah metode ekstraksi dengan pendekatan yang sederhana yang umum digunakan untuk mencegah kerusakan pada senyawa-senyawa yang rentan terhadap panas (termolabil) (Mukhriani, 2014). Hasil ekstraksi dari 1000 gram serbuk simplisia daun kakao diperoleh ekstrak kental 86,254 gram dengan ekstrak berwarna coklat kehitaman. Metode fraksinasi yang digunakan adalah partisi cair-air. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan sifat kepolarannya. Hasil fraksi etil asetat yang didapat yaitu 4,614 gram dan fraksi n-heksan 11,124 gram.

Penetapan karakterisasi simplisia dilakukan untuk mengetahui kualitas simplisia sehingga kriteria umum kualitas simplisia dapat terpenuhi dan menjamin mutu dan efek farmakologinya. Hasil karakteristik dapat di lihat pada tabel 1.

Tabel 1 Hasil Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia Daun Kakao (*Theobroma cacao L.*)

No	Parameter	Rata-rata	MMI (%)
1	KadarAir	3,33%	<10
2	KadarSariLarutAir	9,2%	>7
3	KadarSariLarutEtanol	8,96%	>3,5
4	KadarAbu Total	6,26%	<8
5	KadarAbuTidakLarutAsam	0,38%	<1

Tabel 1 di atas menggambarkan hasil analisis berbagai parameter pada simplisia daun kakao. Dari tabel tersebut, dapat dilihat bahwa kadar air dalam simplisia daun kakao sebesar 3,33%, yang ternyata mematuhi standar umum yang telah ditetapkan dalam buku *Materia Medika Indonesia*, yaitu tidak boleh melebihi 10%. Proses pengukuran kadar air memiliki tujuan yang jelas, yaitu untuk mengatur batas minimum kandungan air dalam bahan, baik dalam bentuk ekstrak maupun simplisia. Semakin tinggi kadar air, semakin rentan bahan tersebut terhadap pertumbuhan jamur dan kapang, yang pada gilirannya dapat mereduksi aktivitas biologis simplisia selama masa penyimpanan (Salim, dkk., 2016). Selanjutnya, penetapan kadar sari yang larut dalam air mengindikasikan jumlah zat yang dapat terlarut dalam pelarut air yang bersifat polar dan terkandung dalam simplisia. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar sari yang larut dalam air pada simplisia daun kakao adalah sebesar 9,2%. Penetapan kadar sari yang larut dalam

etanol, di sisi lain, menunjukkan jumlah zat yang dapat terlarut dalam pelarut etanol, yang bisa bersifat polar atau non-polar. Hasilnya menunjukkan bahwa kadar sari yang larut dalam etanol pada simplisia daun kakao adalah sebesar 8,96%. Penting juga untuk mencatat bahwa dalam penelitian ini, telah dilakukan penetapan kadar abu tidak larut asam yang menghasilkan nilai sebesar 0,38%. Hasil ini juga memenuhi persyaratan standar yang telah ditetapkan, yaitu tidak boleh melebihi 1%. Penetapan kadar abu total simplisia daun kakao mencatat nilai sebesar 6,26%. Penentuan kadar abu total ini mencerminkan jumlah senyawa anorganik yang terdapat dalam simplisia, seperti Magnesium, Kalsium, Natrium, Zink, dan Kalium (Nasution et al., 2023).

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun kakao. Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan Daun Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Daun Kakao

No	Golongan Senyawa	Ekstrak Etanol	Fraksi EtilAsetat	Fraksi N-Heksan
1.	Alkaloid	+	+	+
2.	Flavonoid	+	+	+
3.	Tanin	+	+	-
4.	Saponin	+	-	-
5.	Steroid/ Triterpenoid	+ Steroid	+Steroid	+Steroid
6.	Glikosida	+	+	-

Keterangan:

(+) Positif: Mengandung golongan senyawa

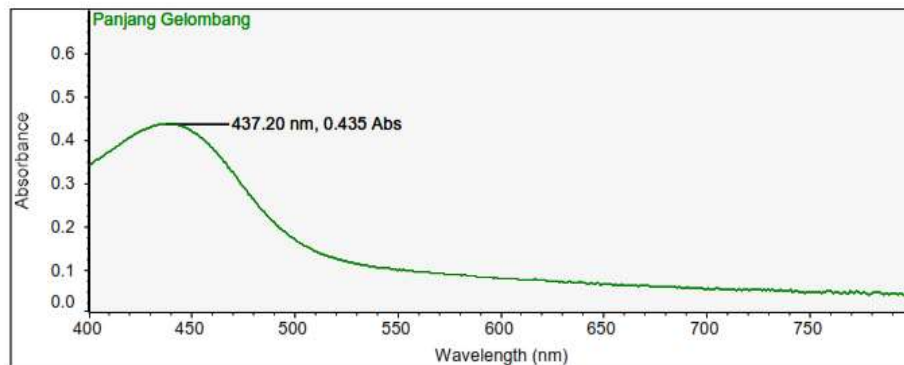
(-) Negatif: Tidak mengandung golongan senyawa

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang terdokumentasi dalam Tabel 2, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol mengandung sejumlah

senyawa kimia, termasuk alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan glikosida. Sementara itu, fraksi etil asetat juga menunjukkan

keberadaan senyawa-senyawa kimia sejenis, yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan glikosida, sedangkan fraksi n-heksan mengandung senyawa kimia golongan alkaloid, flavonoid, dan steroid. Untuk menganalisis kadar flavonoid dalam sampel, digunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Proses analisis flavonoid melibatkan reaksi senyawa flavonoid dengan reagen pembentuk warna, dalam hal ini $AlCl_3$, untuk menghasilkan serapan pada panjang

gelombang sinar tampak. Tahapan awal dalam pengujian flavonoid adalah dengan mengukur panjang gelombang maksimum dari larutan kuersetin dengan konsentrasi $4 \mu\text{g/ml}$ dalam metanol, yang menghasilkan panjang gelombang $437,20 \text{ nm}$ dengan absorbansi sebesar $0,435$. Informasi lebih lanjut mengenai hasil pengukuran panjang gelombang maksimum dapat ditemukan dalam Gambar 1.



Gambar 1 Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Pada penentuan warna larutan kuersetin, penting untuk menemukan waktu yang tepat untuk melakukan pengukuran karena besarnya nilai absorbansi pada spektrofotometri sangat dipengaruhi oleh karakteristik warna. Proses penentuan waktu yang optimal dilakukan dengan menggunakan larutan kuersetin dengan konsentrasi $4 \mu\text{g/ml}$ yang diukur pada panjang gelombang $437,20 \text{ nm}$. Hasil dari pengukuran waktu operasional menunjukkan bahwa waktu yang paling stabil untuk melakukan pengukuran adalah antara menit ke-34 hingga ke-37. Waktu ini dikenal sebagai waktu keputusan operasional, yaitu saat di mana respons atau pembentukan warna mencapai tingkat konsistensi yang optimal

dalam pengukuran. Hal ini sangat penting untuk memastikan hasil pengukuran yang akurat (Winata, dkk., 2023).

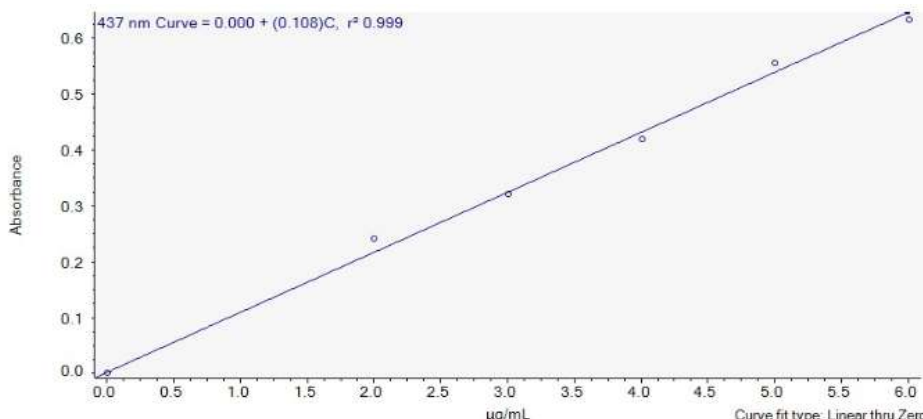
Selain itu, dalam penelitian ini, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi kuersetin dengan mengukur absorbansi dari larutan baku kuersetin pada berbagai konsentrasi. Hasil pengukuran absorbansi ini kemudian digunakan untuk membuat persamaan regresi linear, yang digambarkan dalam Tabel 3. Dengan demikian, kurva kalibrasi ini menjadi acuan untuk mengukur konsentrasi kuersetin dalam sampel berdasarkan absorbansi yang dihasilkan dalam pengujian spektrofotometri UV-Vis.

Tabel 3. Nilai Absorbansi Larutan Baku Kuersetin

Konsentrasi	Absorbansi	Persamaan Regresi
0	0,000	$y = 0,1056x + 0,0094$
2	0,241	
3	0,320	
4	0,419	
5	0,554	
6	0,634	

Persamaan regresi yang diperoleh dari larutan baku kuersetin yaitu $y = 0,1056x + 0,0094$ dengan koefisien korelasi yang diperoleh sebesar

0,9980. Nilai linieritas menunjukkan korelasi antara konsentrasi dan absorbansi yang dihasilkan. Seperti yang terlihat pada gambar 2.



Gambar 2 Kurva Kalibrasi Kuersetin

Penetapan kadar flavonoid dilakukan dengan metode spektrofotometri yang mengandalkan pembentukan kompleks antara $AlCl_3$ dengan gugus keto pada atom C-4 serta gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bersebelahan pada molekul flavon dan flavonol. Pada tahap ini, penambahan aluminium klorida menginduksi pembentukan kompleks asam yang stabil dengan gugus orthohidroksil yang terdapat pada cincin A atau B dalam senyawa-senyawa flavonoid (Chang et al., 2002). Untuk keperluan penetapan kadar flavonoid, digunakan kuersetin sebagai senyawa standar. Pemilihan kuersetin sebagai larutan standar didasarkan pada distribusi yang luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Sekitar 60-75% dari flavonoid dalam tumbuhan terdiri dari kuersetin dan glikosidanya. Kuersetin juga termasuk dalam golongan flavonoid yang dapat membentuk kompleks dengan $AlCl_3$ (Bangun, dkk., 2021). Penentuan kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan dihitung dengan mengukur absorbansi sampel yang telah dibuat dalam enam replikasi. Nilai absorbansi ini kemudian digunakan dalam persamaan regresi linier $y = ax + b$, yang diperoleh dari kurva kalibrasi kuersetin. Dengan demikian, konsentrasi (x) kuersetin dapat dihitung. Nilai x ini selanjutnya digunakan dalam perhitungan kadar flavonoid total.

Tabel 4. Kadar Flavonoid Total Pada Daun kakao (*Theobroma cacao L.*).

Sampel	Kadar Flavonoid Total (mgQE/g)
Ekstrak Etanol	39,1422 ± 0,0540 mg QE/g
Fraksi Etil Asetat	45,274 ± 0,0629 mg QE/g
Fraksi N-Heksan	21,4812 ± 0,7048 mgQE/g

Dari data yang terdapat dalam Tabel 3, diperoleh bahwa kadar flavonoid total tertinggi pada daun kakao terdapat dalam fraksi etil asetat, dengan nilai sekitar 45,274 ± 0,0629 mg QE/g, diikuti oleh ekstrak etanol dengan nilai sekitar 39,1422 ± 0,0540 mg QE/g, dan fraksi n-heksan dengan nilai sekitar 21,4812 ± 0,7048 mg QE/g. Hasil penelitian ini sejalan dengan temuan yang dilaporkan dalam penelitian oleh Wulandari et al. (2022) mengenai kadar flavonoid total dalam daun kapuk randu (*Ceiba pentandra L.*). Dalam penelitian tersebut, kadar flavonoid total tertinggi juga ditemukan pada fraksi etil asetat, yaitu sekitar 51,833 mg QE/g atau 5,1833%, kemudian pada ekstrak etanol sebesar 31,663 mg QE/g atau 3,1667%, dan pada fraksi n-heksan sebesar 5,167 mg QE/g atau 0,5167%.

Hal serupa juga ditemukan dalam penelitian yang dilakukan oleh Nur et al. (2019) mengenai kadar flavonoid dalam ekstrak dan fraksi daun jati putih (*Gmelina arborea Roxb.*). Dalam penelitian tersebut, kadar flavonoid terbesar juga ditemukan dalam fraksi etil asetat, diikuti oleh ekstrak etanol dan fraksi n-heksan.

Dengan demikian, hasil penelitian ini konsisten dengan temuan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa fraksi etil asetat cenderung mengandung kadar flavonoid total yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol dan fraksi n-heksan pada tumbuhan-tumbuhan lainnya.

KESIMPULAN

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanol terkandung senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan glikosida. Sementara itu, fraksi etil asetat juga menunjukkan adanya senyawa kimia yang termasuk dalam golongan alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan glikosida, sedangkan fraksi n-heksan menunjukkan keberadaan senyawa kimia dari golongan alkaloid, flavonoid, dan steroid. Khusus untuk kadar flavonoid dalam daun kakao, hasil analisis menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanol terdapat sekitar $39,1422 \pm 0,0540$ mg QE/g, dalam fraksi etil asetat terdapat sekitar $45,274 \pm 0,0629$ mg QE/g, dan dalam fraksi n-heksan terdapat sekitar $21,4812 \pm 0,7048$ mg QE/g. Dapat disimpulkan bahwa kadar flavonoid tertinggi terdapat dalam fraksi etil asetat.

REFERENSI

- Andry, M., Khairani, T. N., Tarigan, R. E., Nursafwati, N., Nasution, M. A., Tambunan, I. J., & Rezaldi, F. (2023). Antibacterial Activity Test of Sweet Corn (*Zea Mays L.*) Ethanol Extract on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Epidermidis* Bacteria: Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Jagung Manis (*Zea Mays L.*) terhadap Bakteri *Escherichia Coli* dan *Staphylococcus Epidermidis*. *Manganite| Journal of Chemistry and Education*, 2(1), 15-23.
- Aminah., Tomahayu & Abidin, Z. (2017). *Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (Persea americana mill) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis*. Jurnal Fitofarmaka Indonesia. Vol.4. No.2
- Bangun, P., P.,A. dkk. (2021). Analisis Kadar Total Flavonoid Pada Daun dan Biji Pepaya (*Carica papaya L.*) Menggunakan Metode Spektrofotometer Uv-Vis. JIFA : Jurnal Ilmiah Farmasi attamru.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chem, J.,2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods,*Journal Food Drug Analysis*, 10: 178-182.
- Depkes RI. (1979). *Farmakope Indonesia. Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Faisal, H., Sastra, H., Andry, M., Sari, M., Chan, A., & Nasution, M. A. (2023). Formulasi sediaan pasta gigi ekstrak etanol buah takokak (*Solanum torvum Sw.*) dan tulang ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) terhadap bakteri *Streptococcus viridans* dan bakteri *Escherichia coli*. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 6(3), 1322-1338.
- Fitri, K., Khairani, T. N., Andry, M., Rizka, N., & Nasution, M. A. (2023). Uji Aktivitas Krim Anti Jerawat Ekstrak Etanol Daun Seroja (*Nelumbo nucifera G.*) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 6(1), 37-45.
- Hasanah, M., Amaliani, S., Rikmasari, Y.(2017). *Analisis Antioksidan dariBerbagai Fraksi Daun Cokelat (Theobroma cacao L.)*. *JurnalIlmiah Bakti Farmasi*, 2(1), 33-40
- Mandhaki, N., Huda, C., Putri, A, E. (2021). Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*. Vol.3.No.2
- Mukhriani, dkk. (2015). Analisis Kadar Flavonoid Total Pada EkstrakDaun Sirsak (*Annona Muricata L.*) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis.*Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar*. 3(2) : 37
- Nasution, M. A., Sari, M., Andry, M., Syahputri, H., Novranda, P. (2023). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sisik Naga Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Salmonella typhi*. *Jurnal Dunia Farmasi*, 7(2), 125-136.
- Nur, S., Sami, F. J., Awaluddin, A., & Afsari, M. I. A. (2019). Korelasi antara kadar total flavonoid dan fenolik dari ekstrak dan fraksi daun jati putih (*Gmelina arborea Roxb.*) terhadap aktivitas antioksidan.

- Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)*, 5(1), 33-42.
- Osman, H., R. Nasarudin dan S. L. Lee. (2004). Extracts of Cocoa (*Theobroma cacao L.*) Leaves and Their Antioxidation Potential. *Journal of Food Chemistry*, 86, 41-46.
- Parbuntari, H., Prestica, Y., Gunawan, R., Nurman, M. N., & Adella, F. (2018). Preliminary phytochemical screening (qualitative analysis) of cacao leaves (*Theobroma cacao L.*). *EKSAKTA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 19(2), 40-45.
- Salim, M., Sulityaningrum, N., Isnawati, A., Sitorus, H., Yahya., Ni'mah, T. (2016). Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Kulit Buah Duku (*Lansium domesticum Corr*) dari Provinsi Sumatera Selatan dan Jambi. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 6(3): 121-122.
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). *Natural product isolation. Editor. Natural Product Isolation. 2nd ed. Totowa (New Jersey)*. Humana Press Inc.
- Septiana, L., Tarigan, R. E., Andry, M., Irawan, V. A., & Nasution, M. A. (2023). Uji efektivitas ekstrak etanol daun senggani (*Melastoma malabathricum L.*) sebagai antihipertensi pada mencit putih jantan (*Mus musculus*). *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 6(3), 1339-1345.
- Suhaenah, A. dkk. (2021). Penetapan Kadar Flavonoid Fraksi Etil Asetat Daun Karet Kebo (*Ficus elastica*) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *As-Syifaa Jurnal Farmasi*. 13(1) : 48-49.
- Ulfah, M., Mulyati, S., Yunita, K. (2022). *Standarisasi dan Aktivitas Tabir Surya Ekstrak Etanol Daun Kakao (Theobroma cacao L.)*. *Jurnal Pharmascience*, Vol.9 No. 1. Hal 96-105.
- Winahyu, D. A., dkk. (2019). Penetapan Kadar Flavonoid Pada Kulit Batang Kayu Raru (*Cotyleloblummelanoxylon*) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Analisis Farmasi*. Vol.4 No.1. Hal 32.
- Winata, H. S., Faisal, H., Andry, M., Aulia, N., Nasution, M. A., & Tambunan, I. J. (2023). Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol buah asam kandis (*Garcinia xanthochymus*) dengan metode spektrofotometri Uv-Vis dan LCMS. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 6(3), 935-950.
- Wulandari, H., Rohama, R., & Darsono, P. V. (2022). D Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Kapuk Randu (*Ceiba pentandra (L.) Gaertn*) berdasarkan Tingkatan Fraksi: Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Kapuk Randu (*Ceiba pentandra (L.) Gaertn*) berdasarkan Tingkatan Fraksi. *Journal Pharmaceutical Care and Sciences*, 3(1), 45-60.