

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara iklim tropis karena dilewati oleh garis khatulistiwa sehingga mengakibatkan tingginya intensitas matahari di Indonesia (Fitraneti *et al.*, 2024). Menurut Badan Meteorologi, Klimatologi, dan Geofisika (BMKG) pada pertengahan tahun 2024, indeks ultraviolet (UV) di Indonesia dengan indeks UV 8-11 yang menunjukkan tingkat paparan radiasi sinar UV sudah masuk dalam kategori bahaya sangat tinggi hingga ekstrem.

Paparan sinar UV yang berlebihan dan dalam jangka waktu panjang dapat menimbulkan efek negatif karena dapat memicu terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) di fibroblas dan keratinosit. Terbentuknya ROS pada sel kulit menyebabkan kulit mengalami stress oksidatif dan berakibat terhadap kerusakan sel kulit terutama pada membran sel serta pada DNA mitokondria. Hal tersebut dapat memicu timbulnya berbagai gangguan dermatologis seperti penuaan dini, kulit kemerahan (eritema), elastosis, keriput, tekstur kulit kasar, pigmentasi, kulit terbakar (*sunburn*), dan kanker kulit (Gromkowska-Kępa *et al.*, 2021). Menurut *World Health Organization* (WHO), salah satu upaya perlindungan kulit dari paparan radiasi UV adalah dengan pemakaian tabir surya.

Tabir surya umumnya mengandung antioksidan untuk melindungi dari radikal bebas. Aktivitas tabir surya dapat dinyatakan dengan *Sun Protection Factor* (SPF) yang menunjukkan seberapa lama seseorang dapat berada di bawah paparan sinar matahari langsung tanpa menyebabkan kulit terbakar (Khan, 2018). Penggunaan antioksidan sintetik dinilai berbahaya jika digunakan secara terus-menerus, karena dikhawatirkan menimbulkan efek samping pada kulit manusia. Menurut Dewi & Yowani, (2023) sediaan yang mengandung komponen antioksidan alami dinilai lebih aman digunakan karena memiliki potensi kecil untuk menyebabkan iritasi dan lebih muda diterima.

Antioksidan merupakan molekul yang mampu menghambat oksidasi molekul lain, senyawa tersebut mampu mengubah hidroperoksida menjadi spesies non radikal, menyerap radiasi UV atau menonaktifkan oksigen tunggal (Pai *et al.*, 2014) (Moharram & Youssef, 2014). Aktivitas antioksidan dapat diukur menggunakan metode DPPH yang dinilai memberikan respon yang lebih baik untuk sebagian senyawa fenolik (Gulcin & Alwasel, 2023). Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam parameter *Antioxidant Activity Index* (AAI) untuk mengetahui aktivitas peredam radikal bebas dan penggolongan aktivitas antioksidan (Sawiji & La, 2021). Salah satu bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan adalah kakao, khususnya pada bagian biji (Wibawa, Mahendra, *et al.*, 2024).

Biji kakao mengandung senyawa bioaktif berupa polifenol yang berkhasiat sebagai antioksidan alami yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh (Oktoba *et al.*, 2023). Pada penelitian Indiartha *et al.*, (2019) disebutkan bahwa senyawa polifenol pada biji kakao paling banyak adalah golongan flavonoid. Menurut Kaffah, (2020), antioksidan yang terkandung di dalam kakao, terutama senyawa fenolik, dapat mengurangi berbagai dampak negatif dari sinar UV dan radikal bebas. Menurut penelitian Wibawa, Pramitha, *et al.*, (2024) berdasarkan indeks aktivitas antioksidan, kapasitas antioksidan pada biji kakao yang paling tinggi ada pada fraksi n-butanol yaitu sebesar 4,64 dibandingkan dengan fraksi etil asetat sebesar 0,42, dan fraksi n-heksana sebesar 0,46, serta pada fraksi etil asetat dan n-butanolnya terkandung senyawa flavonoid. Kakao juga merupakan tanaman yang tergolong sebagai komoditas unggulan perkebunan Indonesia (BPS, 2023). Tingginya produksi kakao ini menyebabkan kakao mudah diperoleh sehingga berpotensi dimanfaatkan sebagai bahan baku produk.

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan dan menentukan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) pada fraksi etil asetat dan n-butanol biji kakao.

UNMAS DENPASAR

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

- 1 Bagaimana aktivitas antioksidan (AAI) pada fraksi biji kakao?
- 2 Bagaimana nilai *Sun Protection Factor* (SPF) fraksi biji kakao pada konsentrasi tertinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka dapat dibuat tujuan penelitian sebagai berikut:

- 1 Untuk mengetahui aktivitas antioksidan (AAI) pada fraksi biji kakao
- 2 Untuk mengetahui nilai *Sun Protection Factor* (SPF) fraksi biji kakao pada konsentrasi tertinggi

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan mampu menjadi landasan ilmiah mengenai aktivitas antioksidan (AAI) dan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) dari fraksi biji kakao.

1.4.2 Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan mampu menjadi inovasi untuk penelitian selanjutnya dalam mengembangkan sediaan antioksidan dan tabir surya dari bahan alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao



Sumber: Apriyanto, (2021, Gambar 2.1)

Gambar 2.1: Buah Kakao

Kakao atau *Theobroma cacao* L. merupakan tanaman yang berasal dari Amerika, tempat tinggal suku Maya dan Aztec. Masyarakat kuno menggunakan kakao sebagai tanaman obat untuk mengobati berbagai penyakit termasuk anemia, kelelahan mental, tuberkulosis, demam, asam urat, dan batu ginjal. Pohon kakao dapat tumbuh secara liar di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia, termasuk Indonesia (Zainal *et al.*, 2016).

Kakao dianggap sebagai komoditas unggulan perkebunan di Indonesia dan berdasarkan data *International Cocoa Organization* (ICCO) pada 2021/2022, Indonesia menduduki peringkat ke-7 sebagai negara penghasil kakao terbesar di dunia, dengan memproduksi 200.000 ton biji kakao setiap tahunnya (BPS, 2023) (Widhiyoga & Wijayati, 2022). Berdasarkan data BPS (2023), pada tahun 2022 produksi biji kakao di Bali sebesar 4802 ton. Biji kakao yang difermentasi dan dikeringkan adalah produk mentah yang sangat ekonomis yang digunakan dalam pembuatan cokelat dan produk pangan lainnya. Industri farmasi dan kosmetik juga menggunakan lemak kakao yang dihasilkan dari biji kakao (Racine *et al.*, 2019).

Morfologi akar kakao termasuk akar tunggang dengan panjang akarnya sekitar 15 meter untuk akar lurus ke bawah dan sekitar 8 meter untuk akar ke

samping. Tanaman kakao dapat mencapai tinggi 1,8-3 meter setelah tiga tahun dan 4,5-7 meter setelah dua belas tahun. Tanaman kakao adalah jenis pohon tahunan atau perennial (Juliasih *et al.*, 2023).

Daun kakao memiliki bentuk daun memanjang dengan ujung daun runcing dan tajam, serta daun berwarna hijau tua. Pada permukaan daun terasa halus dan kasar dengan tepi daun kakao terlihat bergerigi. Bunga kakao memiliki variasi warna, ada yang berwarna kuning, merah muda, dan putih. Posisi bunga terletak di persimpangan cabang. Bunga kakao tumbuh dan berkembang biak dari daun ketiak pada batang dan canang. Lokasi tempat bunga kakao tumbuh secara bertahap membesar dan menebal seiring waktu, membentuk bantalan bunga (Utama, R.F., *et al.*, 2023). Bunga kakao terdiri dari 5 daun kelopak bebas, 5 daun mahkota, dan 10 tangkai sari. Tangkainya kecil dengan panjang 1-1,5 cm dan daun mahkotanya panjangnya 6-8 mm (Yusuf *et al.*, 2018).

Buah kakao memiliki bentuk yang beragam yaitu lonjong, bulat, dan bulat memanjang. Ujung buah kakao tampak tampak bengkok, runcing, dan tumpul. Buah kakao memiliki berbagai warna, mulai dari kuning, kuning kemerahan, hingga jingga. Saat masih muda buahnya berwarna hijau atau sedikit keputihan, namun saat matang warnanya berubah menjadi kuning. Selain itu, ada buah kakao yang berwarna merah saat muda dan saat matang berubah menjadi jingga. Buah kakao dapat berukuran 10-30 cm, tergantung pada budidaya dan faktor lingkungan selama perkembangan buah. Permukaan buah kakao halus, kasar, dan bergerigi (Utama, R.F., *et al.*, 2023).

Biji kakao memiliki warna merah tua atau ungu tua dengan jumlah biji kakao antara 20-50 biji per buah. Biji kakao terdiri dari dua buah biji yang saling melipat dan pangkalnya menempel pada sumbu embrio. Jenis *Criollo* memiliki biji putih, sedangkan *Forastero* memiliki biji ungu. Daging buah (*pulp*) berwarna putih yang memiliki rasa manis dan asam. Biji kakao terbungkus atas kulit biji (*testa*) (Utama, R.F., *et al.*, 2023).

2.2 Kandungan Biji Kakao

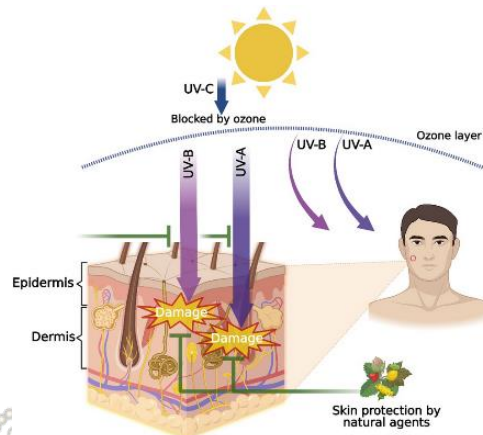
Biji kakao banyak digunakan sebagai bahan dalam pembuatan suatu produk. Tingginya aktivitas antioksidan pada biji kakao dikarenakan kakao merupakan sumber zat bioaktif yang kaya. Salah satu kelompok senyawa fenolik terbesar dan paling beragam yang ditemukan dalam biji kakao adalah flavonoid. Kandungan flavon-3-ol yang tinggi, terutama epikatekin dan katekin, serta prosianidin oligomerik, dan polimerik adalah penyebab utamanya tingginya antioksidan pada biji kakao (Oracz & Nebesny, 2016). Senyawa fenolik lainnya yang ditemukan pada biji kakao adalah antosianin, flavanol, flavon, fenol, asam fenolik, dan turunan stilbene terhidroksilasi. Pada penelitian Indiarto *et al.*, (2019) disebutkan bahwa senyawa polifenol pada biji kakao paling banyak adalah golongan flavonoid, yaitu $\pm 58\%$ proantosianidin, $\pm 37\%$ flavan-3-ol/flavanol, $\pm 4\%$ antosianidin, dan $\pm 1\%$ flavanol glikosida. Senyawa flavonoid mampu menyerap radiasi UV karena terdapat gugus kromofor dalam strukturnya (Nunes *et al.*, 2018).

Aktivitas antioksidan yang tinggi ini terjadi karena senyawa memiliki kemampuan dalam menangkap radikal bebas, mengkelat ion logam, mengikat protein, dan menghambat enzim yang menghasilkan radikal superoksida (Oracz & Nebesny, 2016). Menurut penelitian Wibawa, Pramitha, *et al.*, (2024), berdasarkan indeks aktivitas antioksidan, kapasitas antioksidan pada biji kakao yang paling tinggi ada pada fraksi n-butanol yaitu sebesar 4,64 dibandingkan dengan fraksi etil asetat sebesar 0,42, serta melalui skrining fitokimia yang dilakukan terdapat kandungan flavonoid pada fraksi n-butanol dan fraksi etil asetat biji kakao. Menurut penelitian dari Chaisu & Chiu, (2019), total flavonoid biji kakao sebesar 131,74 mg QE/100 g.

2.3 Sinar Ultra Violet

Sinar matahari memiliki efek yang menguntungkan yaitu penyinaran dalam jumlah yang sedang dapat membuat tubuh merasa nyaman dan sehat. Manfaat sinar matahari yang paling umum diketahui adalah membantu mengubah dehidrokolesterol menjadi previtamin D3 pada kulit manusia. Namun, paparan

sinar matahari yang berlebihan dapat membahayakan kulit. Hal ini disebabkan oleh kandungan sinar UVA, UVB, dan UVC yang ada dalam sinar matahari (He *et al.*, 2021).



Sumber: Verma *et al.*, (2024, Gambar 2.1)

Gambar 2.2: Penetrasi Kulit Oleh Radiasi UV dengan Panjang Gelombang Berbeda

Berdasarkan panjang gelombangnya UVA memiliki panjang gelombang terpanjang yaitu 320-400 nm, dilanjutkan dengan UVB 290-320 nm, dan UVC 100-280 nm (Hernández *et al.*, 2019). Umumnya, sinar matahari mengandung UVA sebesar 90-95% dan UVB 5-10%, sedangkan UVC tidak sampai ke bumi karena sudah terserap oleh lapisan ozon (Young *et al.*, 2017). Radiasi UV memiliki efek negatif pada kulit bergantung pada panjang gelombangnya, sehingga semakin pendek panjang gelombangnya maka akan lebih berbahaya terhadap kulit. Meskipun UVB memiliki aktivitas biologis yang tinggi, sebagian besar UVB diserap atau disaring oleh lapisan ozon dan komponen atmosfer lainnya saat sinar matahari melewati atmosfer, oleh karena itu UVB tidak dapat menembus lebih jauh dari lapisan kulit superfisial, yang terdiri dari unsur-unsur sel epidermis seperti protein ataupun DNA. Sedangkan, UVA dapat masuk ke dalam kulit sampai ke lapisan basal epidermis dan bahkan sampai ke fibroblast dermis, yang bertanggung jawab atas proses penuaan kulit (Verma *et al.*, 2024).

Radiasi UV dapat menghasilkan radikal bebas, seperti ROS yang merusak matriks ekstraseluler kulit, termasuk kolagen dan serat elastis. Hal ini menyebabkan

kulit tampak pucat, kehilangan elastisitas, dan kendur, serta dapat juga membuat kulit lebih mudah memar dan robek. Hal ini terjadi karena paparan sinar UV menghancurkan struktur dermal normal dan menggantikan dermis superfisial yang kaya kolagen dengan jaringan elastis yang tidak berfungsi yang disebut dengan proses solar elastosis (Bernstein *et al.*, 2020).

2.4 Tabir Surya

Tabir surya adalah kosmetik pelindung yang memiliki fungsi untuk menyaring dan menahan kulit dari paparan sinar UV yang dapat merusak kulit. Bahan aktif dalam tabir surya dapat mengabsorpsi, memantulkan, atau menghamburkan radiasi UV. Nilai SPF tabir surya menentukan seberapa baik tabir surya dalam melindungi kulit dari sinar UV (Gurning *et al.*, 2016). Terdapat dua jenis tabir surya, yaitu tabir surya fisik yang bekerja dengan memantulkan radiasi UV dan tabir surya kimia yang bekerja dengan menyerap radiasi UV (Rauf *et al.*, 2017).

Pada umumnya, bahan tabir surya terdiri dari dua jenis bahan yaitu tabir surya anorganik (*physical blocker*) yang bekerja dengan cara memantulkan dan menyebarkan radiasi, dan tabir surya organik (*chemical absorber*) yang bekerja dengan cara menyerap dan mencegah sinar UV masuk ke dalam epidermis (Rachmani *et al.*, 2023) (Geoffrey *et al.*, 2019). Dalam beberapa kasus, senyawa tabir surya sintetis yang banyak digunakan dalam produk yang telah beredar dapat menyebabkan iritasi kulit dan reaksi alergi (Wisudyaningsih *et al.*, 2024). Salah satu bahan yang sering ada dalam tabir surya sintetis adalah turunan benzofenon, yaitu benzofenon-3 (BP-3) atau oxybenzone (Mustieles *et al.*, 2023). Menurut penelitian Mustieles *et al.*, (2023), BP-3 berpotensi mengganggu endokrin. Tabir surya kimia dinilai banyak menimbulkan efek negatif seperti alergi, neurotoksisitas, dan efek hormonal yang merugikan. Selain itu, tabir surya dengan bahan oxybenzone memberikan dampak buruk terhadap ekosistem laut (Bernstein *et al.*, 2020). Hal tersebut menyebabkan diperlukannya pengembangan senyawa tabir surya dari bahan alam.

2.5 Sun Protection Factor (SPF)

Sun Protection Factor (SPF) merupakan kemampuan dari tabir surya dalam melindungi kulit dari paparan sinar UV (Gurning *et al.*, 2016). SPF adalah jumlah radiasi UV yang dapat diserap atau dipantulkan oleh tabir surya. Nilai SPF mengacu pada radiasi UV yang akan diterima orang yang menggunakan produk tersebut selama dan segera setelah penggunaan tabir surya (Raymond-Lezman & Riskin, 2024). Nilai SPF dapat dihitung dengan membandingkan berapa lama sengatan matahari terjadi pada kulit dengan menggunakan dan tidak menggunakan tabir surya (Mainnah, Mut, *et al* 2024). Semakin tinggi nilai SPF, maka semakin lama durasi perlindungannya (Raymond-Lezman & Riskin, 2024). Semakin tinggi nilai SPF maka semakin tinggi pula tingkat perlindungannya terhadap radiasi UV (Utami, A.N., *et al* 2021). Suatu sediaan dapat dikategorikan sebagai sediaan tabir surya apabila memiliki nilai SPF pada rentang 2-100 (Mulyani *et al.*, 2015). Adapun klasifikasi proteksi tabir surya berdasarkan nilai SPF disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Klasifikasi Proteksi Tabir Surya

SPF	Kategori Proteksi
<2	Tanpa Proteksi
2-4	Minimal
4-6	Sedang
6-8	Ekstra
8-15	Maksimal
>15	Ultra

Sumber: (Pelizzo *et al.*, 2023)

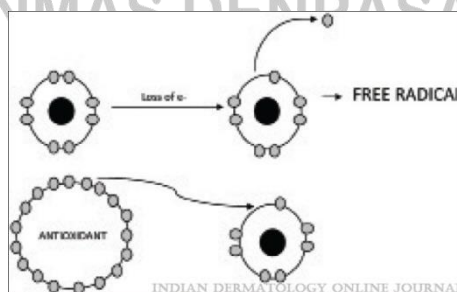
2.6 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang mampu menghambat oksidasi molekul lain. Oksidasi adalah proses dimana terjadi kehilangan elektron atau peningkatan keadaan oksidasi oleh suatu molekul, atom, atau ion (Pai *et al.*, 2014). Molekul dengan sifat antioksidan dapat diperoleh secara endogen maupun eksogen. Enzim antioksidan endogen yang umum adalah *Superoksida Dismutase* (SOD), katalase,

dan *glutation peroksidase* (GSH-Px). Sedangkan antioksidan eksogen, seperti vitamin E dan C, serta bahan alam lain (Munteanu & Apetrei, 2021).

Antioksidan mampu menghambat reaksi berantai oksidasi, bertindak sebagai donor atau akseptor hidrogen radikal bebas, menghasilkan radikal yang lebih stabil. Antioksidan ini biasanya memiliki struktur fenolik dan meliputi mineral antioksidan, vitamin antioksidan, dan fitokimia, seperti flavonoid, katekin, karotenoid, β -karoten, likopen, diterpene, dan turunannya. Senyawa-senyawa ini berinteraksi melalui berbagai mekanisme termasuk pengikatan ion logam, pembersihan ROS, mengubah hidroperoksida menjadi spesies non radikal, menyerap radiasi UV atau menonaktifkan oksigen tunggal, seperti butilhidroksitoluena (BHT) (pai *et al*) (Moharram, H.A., Youssef, 2014).

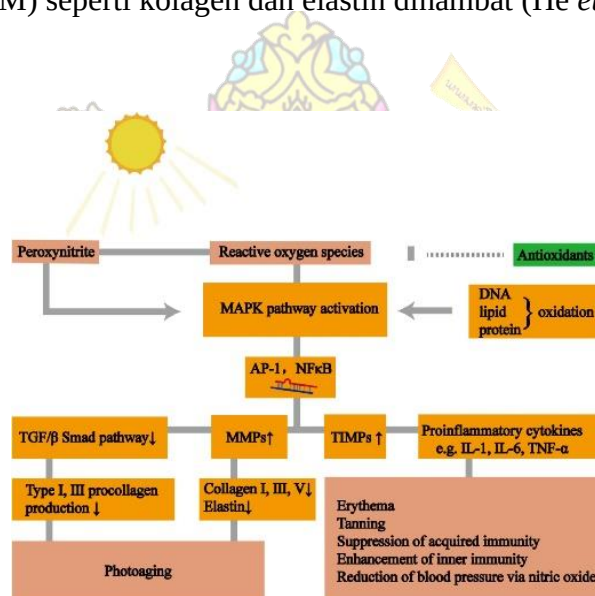
Radikal bebas adalah molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan, bersifat sangat reaktif dan juga tidak stabil. Radikal bebas dapat berfungsi sebagai agen pereduksi atau pengoksidasi dengan mengambil elektron dari molekul lain atau memberikannya pada mereka (Abdulrahman *et al.*, 2024). Molekul yang berpusat pada oksigen disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan molekul yang berpusat pada nitrogen disebut *Reactive Nitrogen Species* (RNS). ROS dan RNS dapat menyebabkan terjadinya kerusakan biologis yang disebut dengan stress oksidatif dan stress nitrosatif. Radikal bebas dengan elektron tidak berpasangan ini mencari dan merebut elektron dari komponen vital, seperti DNA, sitoskeleton, protein seluler, dan membran sel, sehingga mengakibatkan kerusakan sel (Pai *et al.*, 2014).



Sumber: Pai *et al.*, (2014, Gambar 2.2)

Gambar 2.3: Pembentukan Radikal Bebas dan Antioksidan
Meredamkan Radikal Bebas

ROS yang diinduksi UV juga dapat mengubah materi genetik dan konstituen sel lainnya, seperti membran lipid dan protein struktural. Bergantung pada tingkat perubahan molekuler yang diinduksi UV, hal itu dapat merusak jalur transduksi sinyal yang terkait dengan diferensiasi, peradangan, dan penuaan. *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) dapat langsung diaktifkan oleh ROS. Pada akhirnya, kompleks faktor transkripsi (AP-1 dan NF- κ B) dapat dibentuk untuk mengatur transkripsi *Matrix Metalloproteases* (MMPs), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), dan pelepasan sitokin inflamasi. Selain itu, produksi matriks ekstraseluler (ECM) seperti kolagen dan elastin dihambat (He *et al.*, 2021).



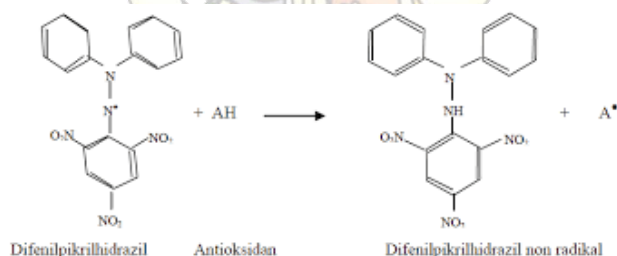
Sumber: He *et al.*, (2021, Gambar 2.3)

Gambar 2.4: Representasi Skematis Dampak ROS Terhadap Kerusakan Kulit

Pengujian antioksidan dapat dilakukan melalui beberapa metode, yaitu, 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), *Cupric Reducing Antioxidant Power* (CUPRAC), *Oxygen Radical Absorption Capacity* (ORAC) (Munteanu & Apetrei, 2021). Pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH sangat banyak digunakan dalam penelitian kefarmasian karena metode ini dinilai cepat, mudah, dan sensitif terhadap sampel dengan konsentrasi kecil (Fatmawati *et al.*, 2023). Dilaporkan bahwa metode DPPH memberikan respon yang lebih baik untuk sebagian senyawa fenolik dan senyawa dengan polaritas terbatas.

Kemampuan penangkal radikal DPPH sebagian besar menggunakan pelarut organik seperti metanol atau etanol. Analisis dilakukan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm (Gulcin & Alwasel, 2023). Selanjutnya akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . IC_{50} merupakan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50% (Rahmadani & Nasution, 2021).

Mekanisme peredaman radikal DPPH yaitu dengan mendonorkan elektron atau atom hidrogen kepada radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan sehingga mengubah radikal bebas menjadi molekul yang lebih stabil dan tidak berbahaya. Proses reduksi terjadi pada masa inkubasi sampel yang ditandai dengan adanya penurunan intensitas warna dari larutan DPPH yaitu dari warna ungu menjadi kuning. Warna yang semakin memudar akan menurunkan nilai absorbansi dan mengindikasikan terjadi peredaman radikal bebas yang semakin besar (Rahmawati *et al.*, 2017). Adapun reaksi peredaman radikal bebas (DPPH) ditunjukkan pada gambar 2.5.



Sumber: Tanzaq *et al.*, (2019, Gambar 2.5)

Gambar 2.5: Peredaman DPPH

Parameter yang digunakan dalam mengukur aktivitas antioksidan pada suatu sampel adalah nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI). Pada Tabel 2.2 ditunjukkan penggolongan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai AAI.

Tabel 2.2 Kategori Antioksidan (AAI)

Nilai AAI	Penggolongan
<0,5	Lemah
0,5-0,1	Sedang
1,0-2,0	Kuat
>2,0	Sangat kuat

Sumber: (Sawiji & La, 2021)

2.7 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi merupakan proses menghilangkan atau memperoleh senyawa yang diinginkan dari bahan sumber. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi fitokimia adalah yang pertama ada pelarut hijau seperti air, etanol, gliserol, minyak lemak, cairan ionik, asam asetat, isopropanolol, CO₂ superkritis, pelarut eutektik dalam, pelarut eutektik dalam alami. Terdapat juga pelarut organik lainnya seperti aseton, kloroform, butanol, metanol, metil asetat, benzene, heksana, sikloheksana.

Metode yang dapat digunakan dalam proses ekstraksi adalah maserasi, perkolasi, rebusan, ekstraksi refluks, ekstraksi soxhlet, ekstraksi cairan bertekanan, ekstraksi gas cair ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro, ekstraksi dengan bantuan ultrasonografi, ekstraksi medan listrik berdenyut, ekstraksi dengan bantuan enzim, ekstraksi fluida superkritis, ekstraksi tekanan hidrostatik tinggi, dan ekstraksi pelarut eutektik alami dan dalam (Kumar *et al.*, 2023).

Maserasi adalah metode ekstraksi yang sederhana dimana serbuk simplisia hanya direndam dalam pelarut yang sesuai, pada metode ini tidak memerlukan adanya panas sehingga dapat digunakan pada senyawa-senyawa yang bersifat termolabil. Prinsip kerja maserasi adalah proses pelarutan suatu zat aktif berdasarkan kelarutannya dalam suatu pelarut (*like dissolve like*) (Atika, 2021). Dalam metode ini, sampel direndam dalam pelarut seperti air, metanol, etanol, petroleum eter, dan lain-lain. Setelah itu didiamkan selama beberapa hari dan terlindung dari cahaya dengan sesekali diaduk untuk mengekstrak zat aktifnya (Hidayat & Patricia Wulandari, 2021).

Pelarut yang digunakan, akan menembus dinding sel dan kemudian masuk ke dalam sel tanaman yang penuh dengan zat aktif. Pertemuan antara zat aktif dan pelarut akan mengakibatkan terjadinya proses pelarutan dimana zat aktif akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang berada di dalam sel mengandung zat aktif, sementara pelarut yang berada diluar sel belum terisi zat aktif, sehingga terjadi ketidakseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dengan konsentrasi zat aktif yang ada di luar sel. Perbedaan konsentrasi ini mengakibatkan terjadinya proses difusi dimana larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar sel dan digantikan oleh pelarut dengan konsentrasi rendah (Atika, 2021).

Keuntungan dari metode maserasi adalah peralatan yang digunakan sederhana, teknik pengerjaannya sederhana dan mudah untuk dilakukan, biaya yang relatif murah, dan proses ekstraksi yang lebih efisien pada filter. Kerugian metode maserasi adalah memerlukan waktu beberapa hari dan pelarut yang digunakan cukup banyak (Wicaksono, 2023). Efisiensi ekstraksi bergantung pada jenis pelarut, waktu ekstraksi, dan suhu ekstraksi (Grdiša *et al.*, 2020). Metanol merupakan pelarut yang memberikan ekstraksi yang lebih baik untuk senyawa flavonoid, tanin, glikosida, senyawa fenolik, dan asam amino (Kumar *et al.*, 2023).

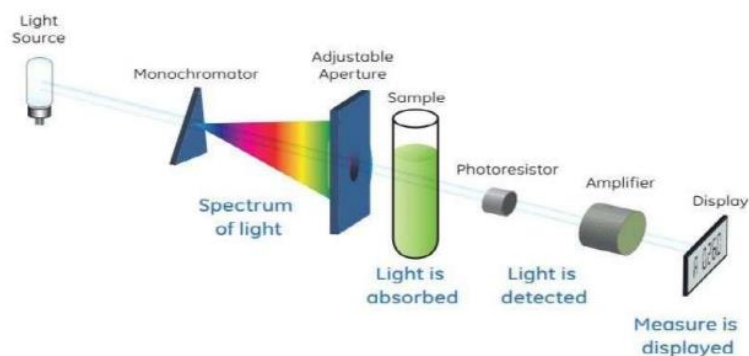
2.8 Fraksinasi

Tujuan utama dari fraksinasi adalah memisahkan komponen senyawa aktif dari ekstrak yang telah dihasilkan. Fraksinasi adalah metode yang digunakan untuk mengisolasi senyawa dari suatu ekstrak dengan memanfaatkan dua jenis pelarut yang tidak bercampur satu sama lain, yang dapat dipisahkan berdasarkan polaritas senyawa tersebut. Untuk senyawa yang bersifat tidak polar, digunakan n-heksan, sementara etil asetat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat semi polar, dan n-butanol digunakan untuk senyawa polar. Prinsip yang diikuti adalah “*like dissolve like*” bahwa senyawa yang memiliki karakteristik non polar akan terlarut dalam pelarut yang juga bersifat non polar, sedangkan senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut yang memiliki sifat polar (Siahaan *et al.*, 2023). Proses fraksinasi ini didasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran dan bobot jenis antara fraksi-fraksi (L. Pratiwi *et al.*, 2016).

2.9 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri adalah metode pengukuran kuantitatif yang didasarkan pada pengukuran absorpsi (penyerapan) radiasi gelombang elektromagnetik. Spektrofotometri terdiri dari dua kata, yaitu spektrometer yang berarti alat yang menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu, dan kata fotometer yang berarti alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan (diteruskan) atau diabsorbsikan (diserap). Sehingga spektrofotometer dapat diartikan sebagai instrumen yang berfungsi untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut diemisikan, direfleksikan, atau ditransmisikan sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer adalah instrumen yang digunakan untuk mengukur jumlah cahaya yang diserap (terukur dalam bentuk transmitansi atau absorbansi) atau intensitas warna yang sesuai dengan panjang gelombang (D. A. Lestari, 2024).

Spektrofotometer terdiri dari beberapa macam yaitu, UV-Vis (*Ultraviolet-Visible*), AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*), MS (*Mass Spectroscopy*), NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), FTIR (*Fourier Transform Infrared*). Spektrofotometer jenis UV-Vis memiliki banyak kelebihan, yaitu sudah banyak digunakan, tersedia di banyak tempat, pengoperasian alat yang mudah, harga analisis murah, minim penggunaan bahan kimia, dan dapat digunakan untuk sampel jenis larutan, gas, atau uap (Suhartati, 2017). Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen dengan teknik spektrofotometer pada daerah ultraviolet dan sinar tampak yang menggunakan cahaya sebagai sumber energi. Alat ini digunakan untuk mengukur serapan sinar ultraviolet atau sinar tampak oleh suatu materi dalam bentuk larutan, gas, atau uap. Namun, umumnya materi harus diubah terlebih dahulu menjadi larutan yang jernih (Suhartati, 2017).



Sumber: Suhartati, (2017, Gambar 2.6)

Gambar 2.6: Prinsip Kerja Spektrofotometer UV-Vis

Prinsip kerja dari spektrofotometer UV-Vis yaitu dimana cahaya dipancarkan melalui monokromator yang menguraikan sinar masuk dari sumber cahaya tersebut menjadi pita-pita panjang gelombang yang diinginkan untuk pengukuran suatu zat tertentu. Selanjutnya cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan) di dalam kuvet, maka sebagian cahaya tersebut akan diserap, dipantulkan, dan dipancarkan. Jumlah cahaya yang diserap larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor, dimana sinyal elektrik ini sebanding dengan cahaya yang diserap oleh larutan tersebut. Nilai sinyal elektrik yang dialirkan ke pencatat dapat dilihat sebagai angka (Afifah, 2016). Pengukuran spektrofotometer UV-Vis dilandasi oleh hukum Lambert Beer yaitu bila suatu cahaya monokromatis dilewatkan melalui suatu media yang transparan, maka intensitas cahaya yang ditransmisikan sebanding dengan tebal dan kepekaan media larutan yang digunakan. (Suhartati, 2017).

Sampel yang sering dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis adalah senyawa organik yang memiliki gugus kromofor dan auksokrom. Gugus kromofor adalah gugus fungsional tidak jenuh yang memberikan serapan pada daerah ultraviolet atau cahaya tampak, misalnya heksana, aseton, asetilen, benzena, karbonil, karbondioksida, karbonmonoksida, gas nitrogen. Auksokrom adalah gugus fungsi yang mengandung pasangan elektron bebas berikatan kovalen tunggal, yang terikat pada kromofor yang mengintensifkan absorpsi sinar UV-Vis

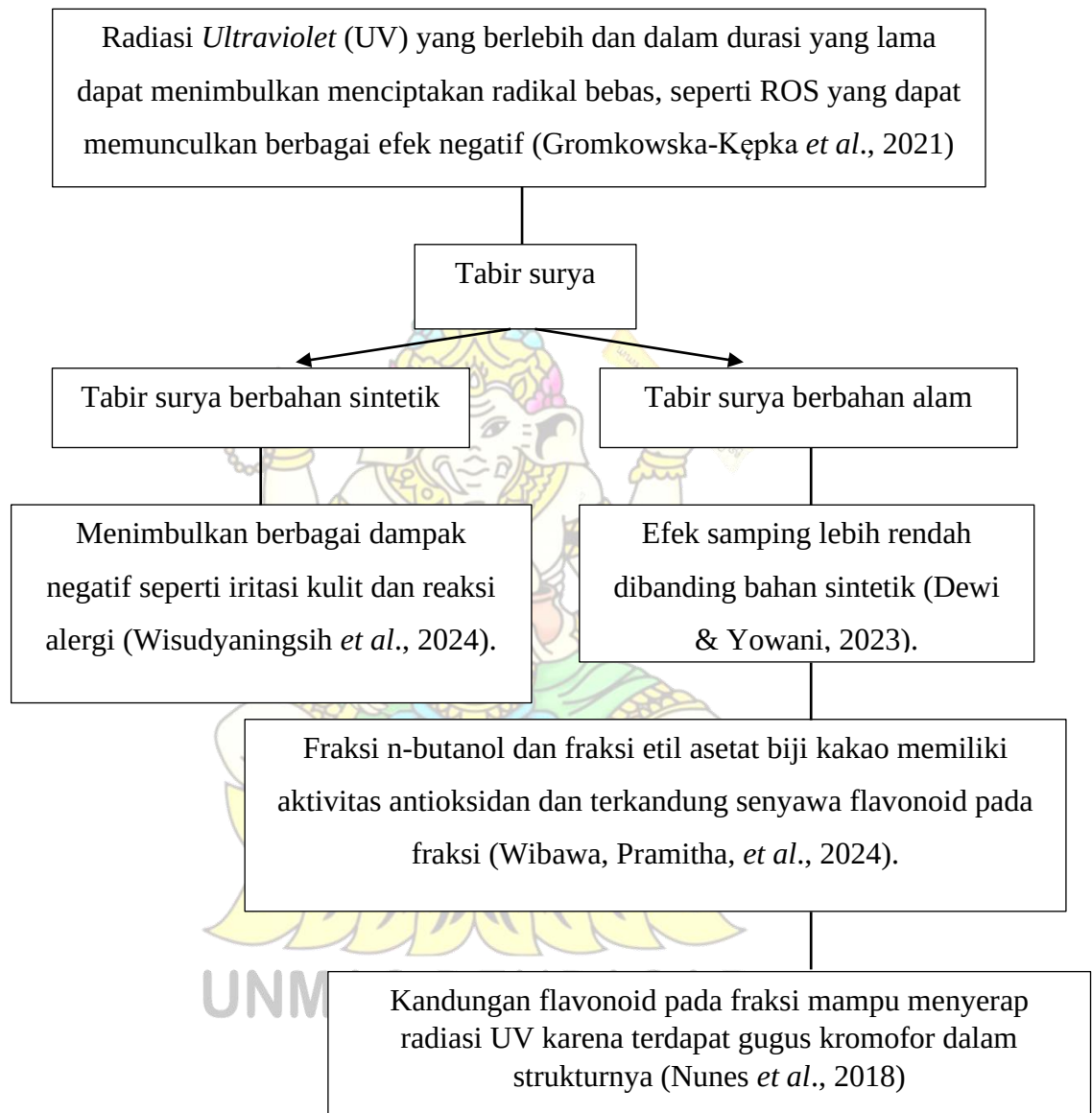
pada kromofor tersebut, baik panjang gelombang maupun intensitasnya, misalnya gugus hidroksi, amina, halide, alkoksi (Suhartati, 2017).

Spektrofotometer Uv-Vis pada penelitian ini merupakan alat yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dari biji kakao. Cahaya yang terdapat dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis merupakan energi, yang ketika mengenai elektron maka akan tereksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi. Eksitasi elektron tersebut direkam dalam bentuk spektrum dan dinyatakan sebagai absorbansi panjang gelombang. Selain itu, spektrofotometri UV-Vis juga dapat digunakan untuk mengetahui panjang gelombang optimum dari suatu senyawa (Suhartati, 2017).



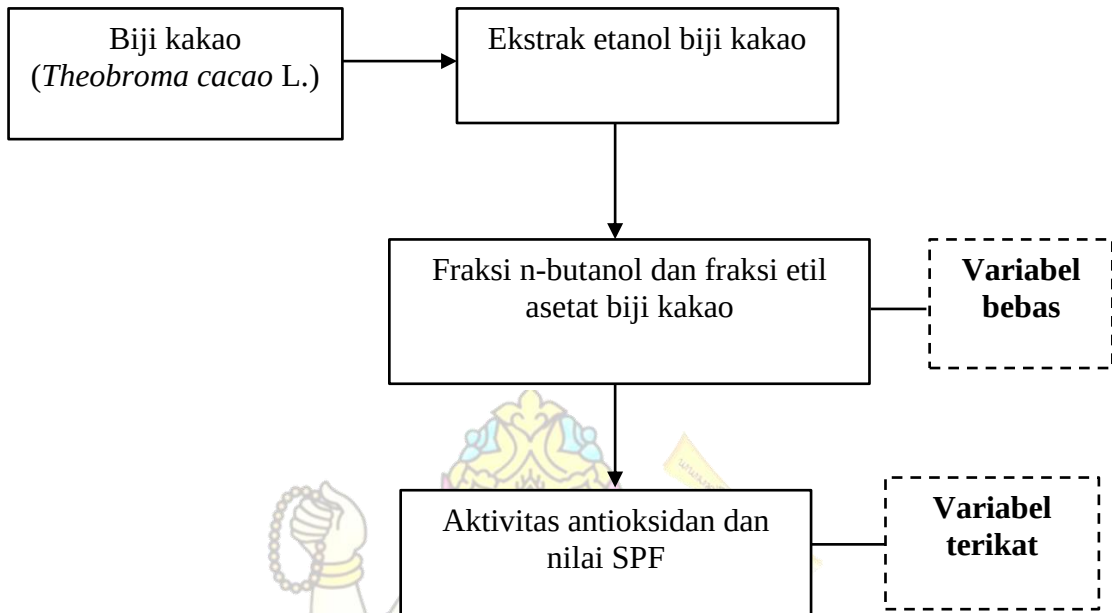
2.10 Kerangka Konseptual

2.10.1 Kerangka teori



Gambar 2.7: Kerangka Teori

2.10.2 Kerangka konsep



Gambar 2.8: Kerangka Konsep

2.11 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Diduga terdapat aktivitas antioksidan yang sangat kuat pada fraksi etil asetat dan n-butanol biji kakao
2. Diduga fraksi etil asetat dan n-butanol biji kakao berpotensi memiliki kemampuan sebagai tabir surya