



**IDENTIFIKASI SENYAWA FRAKSI DAUN KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
MENGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI DAN SPEKTROFOTOMETRI**
*IDENTIFICATION OF COMPOUNDS IN CACAO LEAF FRACTIONS (*Theobroma cacao* L.)
USING CHROMATOGRAPHY AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS*

**Leni nur aliani^{1*}, Nurfadillah^{2*}, Nur widianty³, St Nurasma aulia jalil⁴, Najwa amelia⁵,
Muhammad ilham hamzah⁶, Adelia febrianti wahab⁷, Nindi lestari⁸, Musfira S⁹, Ningrum
anggriani¹⁰**

Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah
Makassar

Email Correspondence: leninuraliani13@gmail.com, nurfadillah84500@gmail.com

Email Corresponding author: fityatunusman@unismuh.ac.id

ABSTRAK

Indonesia merupakan negara tropis dengan keanekaragaman hayati yang tinggi, termasuk potensi sumber daya alam seperti daun kakao (*Theobroma cacao* L.) yang mengandung berbagai senyawa bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dalam fraksi daun kakao melalui pendekatan fraksinasi, kromatografi, dan spektrofotometri UV-Vis. Proses dimulai dengan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian dilakukan fraksinasi cair-padat dengan pelarut n-heksan, etil asetat, etanol, dan akuades. Identifikasi senyawa dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan KLT Preparatif (KLTP), diikuti analisis kuantitatif kadar flavonoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 417 nm dengan kuersetin sebagai pembanding. Hasil menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan etanol mengandung senyawa alkaloid, steroid, dan flavonoid, dengan kadar flavonoid total tertinggi pada fraksi etil asetat sebesar 9,474 mg/mL QE. Analisis KLT memperlihatkan pola fluoresensi yang serupa dengan kuersetin, terutama pada fraksi etanol. Nilai R_f yang diperoleh berada dalam rentang yang baik (0,2–0,8), mengindikasikan keberhasilan pemisahan senyawa. Kesimpulannya, daun kakao memiliki potensi sebagai sumber senyawa bioaktif alami, khususnya flavonoid, yang dapat dikembangkan untuk aplikasi di bidang farmasi dan kesehatan.

Kata kunci: Daun kakao, fraksinasi, Kromatografi, spektrofotometri UV-Vis.

ABSTRACT

Indonesia is a tropical country with high biodiversity, including abundant natural resources such as cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves, which contain various bioactive compounds. This study aims to identify secondary metabolites in cocoa leaf fractions through a combination of fractionation, chromatography, and UV-Vis spectrophotometric methods. The process began with ethanolic extraction (70% ethanol), followed by liquid-solid fractionation using n-hexane, ethyl acetate, ethanol, and distilled water as solvents. Compound identification was carried out using Thin Layer Chromatography (TLC) and Preparative TLC (PTLC), and the total flavonoid content was quantitatively analyzed using UV-Vis spectrophotometry at 417 nm, with quercetin as the standard. Results showed that ethyl acetate and ethanol fractions contained alkaloids, steroids, and flavonoids, with the highest total flavonoid content found in the ethyl acetate fraction (9.474 mg/mL QE). TLC analysis revealed fluorescence patterns similar to quercetin, especially in the ethanol fraction. The obtained R_f values were within the ideal range (0.2–0.8), indicating effective compound separation. In conclusion, cocoa leaves contain significant bioactive compounds, particularly flavonoids, and show promising potential as a natural source for pharmaceutical and health-related applications.

Keywords: Cocoa leaves, fractionation, chromatography, UV-Vis spectrophotometry.

PENDAHULUAN

Indonesia, sebagai negara tropis dengan keanekaragaman hayati tinggi, memiliki sekitar 40.000 jenis tumbuhan, di antaranya 25.000 spesies merupakan tumbuhan biji yang mencakup lebih dari 10% vegetasi dunia. Sebanyak 9.600 jenis di antaranya dikenal sebagai tumbuhan obat, namun baru sekitar 300 yang dimanfaatkan secara tradisional. Selain itu, Indonesia juga merupakan produsen kakao terbesar keempat di dunia dengan produksi mencapai 767.280 ton pada tahun 2018 (Arisanti et al., 2021) (Savira et al., 2024).

Kakao merupakan tanaman dari famili *Sterculiaceae* genus *Theobroma*, spesies (*Theobroma cacao* L.). di Indonesia, tanaman ini disebut cokelat. Morfologinya mencakup batang berkayu cokelat kasar, daun lonjong hijau, dan buah memanjang berdinding tebal (Ahmad et al., 2024).

Daun kakao mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, tanin, senyawa fenolik, teobromin, dan kafein yang memiliki efek antimikroba, terutama terhadap *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini merupakan flora normal hidung dan kulit, namun bisa menyebabkan infeksi saat daya tahan tubuh menurun (Mandhaki, et al., 2021).

Pendekatan fraksinasi dan identifikasi senyawa bioaktif berbasis metode kromatografi dan spektrofotometri menjadi penting untuk mengungkap potensi senyawa alami secara lebih spesifik. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan KLT Preparatif merupakan teknik yang banyak digunakan dalam skrining senyawa metabolit sekunder berdasarkan polaritasnya (Kowalska et al., 2022)

Studi terbaru oleh (Maqfirah et al., 2023) menunjukkan bahwa ekstrak daun kakao memiliki berbagai macam senyawa metabolite dari berbagai fraksi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terdapat dalam fraksi daun kakao menggunakan metode fraksinasi, KLT, dan spektrofotometri UV-Vis.

Pendekatan fraksinasi dan identifikasi senyawa bioaktif berbasis metode kromatografi dan spektrofotometri menjadi penting untuk mengungkap potensi senyawa alami secara lebih spesifik. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan KLT Preparatif merupakan teknik yang banyak digunakan

METODE

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kakao yang diperoleh dari hutan Desa Manggalung, Kecamatan Mandalle, Kabupaten Pangkajene Kepulauan, Provinsi Sulawesi Selatan. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah akuades, Aqua Pro Injeksi, Aluminium Klorida, besi (III) klorida, etanol 70%, etanol Pa, Dragendorf, etil asetat, Lieberman-Buchard, Kalium Hidroksida Etanolik, kuersetin, N-heksana, silika gel, Sodium Sulfat. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital (AciS BC-6000®), beaker glass (Pyrex®), cawan porselen (Pyrex®), chamber, batang pengaduk (Pyrex®), labu ukur (Iwaki®), DRAGONLAB Micropipette Toppette, pipet volume (Pyrex®), pipet tetes, gelas ukur (Pyrex®), corong kaca (Pyrex®), pipa kapiler, pensil, penggaris, spatula, spektrofotometri UV-Vis (Barcov®), pipet tetes, tabung sentrifuge skala, toples kaca, tissue, kertas saring, aluminium foil, alat gelas umum yang ada di Laboratorium Terpadu Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Makassar. Instrument yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rotary Evaporator* (Buchi/Rotavapor R-11®), Sinar UV (*Ultraviolet*) 254 nm dan 366 nm, dan *Centrifuge* PRP (Fulins®). Penelitian ini memiliki beberapa tahapan, diantaranya:

Ekstraksi

Pembuatan ekstrak etanol dari daun kakao dimulai dengan pembuatan maserasi,

menggunakan pelarut etanol 70%. Sebanyak 200 gram simplisia dimasukkan ke dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan 1200 ml etanol 70% (1:6) ke dalam gelas kimia. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dalam wadah kedap udara pada suhu kamar. Selama proses maserasi, ekstrak diaduk selama 5 menit setiap 6 jam. Selanjutnya, penyaringan dilakukan menggunakan kertas saring Whatman untuk memisahkan residu dari filtra setelah itu dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* suhu 50°C dengan kecepatan 65 rpm hingga diperoleh ekstrak kental. Setelah diperoleh ekstrak kental, ekstrak kembali diuapkan pada suhu ruang hingga benar-benar diperoleh ekstrak kental. Dan persentase rendemen dihitung menggunakan rumus (Wardana *et al.*, 2024).

$$\% \text{ Rendamen} = \frac{\text{Berat Ekstrak yang didapat}}{\text{Berat Sampel Awal}} \times 100\%$$

Fraksinasi Cair Padat

Sebanyak 5 g ekstrak daun kakao dipartisi menggunakan metode ekstraksi cair-padat dengan pelarut N-heksan dan etil asetat. Ekstrak etanol dilarutkan dalam N-heksan, lalu disentrifugasi untuk memisahkan bagian yang tidak larut. Bagian tidak larut kemudian diekstraksi ulang dengan etil asetat dan disentrifugasi hingga diperoleh fraksi larut dan tidak larut. Pelarut diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental (Abdullah, *et al.*, 2021).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Bejana dijenuhkan terlebih dahulu dengan fase gerak N-heksan:etil asetat (25:10), sebelum dilakukan pengujian kromatografi lapis tipis. Selanjutnya, kertas saring dimasukkan ke dalam bejana berisi fase gerak dan dibiarkan hingga fase eluen naik/jenuh. Setelah itu, 2 ml dari hasil fraksi kental n-heksan dan etil asetat dilarutkan dengan pelarut yang sama. Untuk fraksi etanol aquades, 1 gram sampel masing-masing dilarutkan dengan pelarut yang sama. Plat silika GF254 diaktivasi dengan dipanaskan dalam oven selama ± 30 menit pada suhu 110°C. Sampel dan pembanding kuersetin ditotolkan pada plat silika menggunakan pipa kapiler, kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan, dan dibiarkan hingga eluen mencapai batas yang ditentukan. Kemudian, plat silika dikeluarkan dan dikeringkan dengan diangin-anginkan. Identifikasi dilakukan dengan menyinari plat menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, lalu dilakukan identifikasi golongan senyawa (Wardana *et al.*, 2024).

1. Alkaloid

Analisis senyawa alkaloid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi dragendorff sebagai penampak bercak. Lempeng sampel positif alkaloid apabila terdapat bercak berwarna jingga dengan latar belakang kuning. Analisis senyawa alkaloid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi dragendorff sebagai penampak bercak. Lempeng sampel positif alkaloid apabila terdapat bercak berwarna jingga dengan latar belakang kuning.

2. Steroid dan Triterpenoid

Analisis senyawa steroid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi Lieberman-buchard. Noda berflorosen coklat atau biru menunjukkan adanya triterpene dan hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid.

3. Flavonoid

Senyawa flavanoid diidentifikasi menggunakan pereaksi Aluminium klorida 5% akan menampakkan senyawa noda berflorosen kuning pada lempeng KLT.

4. Fenol

Identifikasi senyawa fenol dengan pereaksi besi (III) klorida (FeCl_3) 5 % akan menampakkan warna biru atau hitam pada lempeng KLT Analisis senyawa alkaloid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi Dragendorff sebagai penampak bercak. Lempeng sampel positif alkaloid apabila terdapat bercak berwarna jingga dengan latar belakang kuning.

5. Kumarin

Identifikasi golongan senyawa kumarin dengan pereaksi Kalium Hidroksida Etanolik akan menampakkan warna merah pada lempeng.

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Metode ini memanfaatkan fase diam berupa lempeng silika gel berukuran 20×20 cm. Pertama, ditimbang silika gel sebanyak 20 g untuk 1 lempeng preparatif berukuran 20x20 cm. dibasahi silika dengan 50 mL akuades hingga terbentuk suspensi silika. kemudian diratakan silika pada lempeng kaca, dan diamkan 1x24 jam, lalu aktifkan plat silika di oven dengan suhu 110°C selama 30 menit. selanjutnya dilakukan isolasi senyawa pada KLTP dengan menotolkan sampel pada plat KLTP menggunakan pipet tetes secara kontinyu hingga membentuk pita, lalu dikeringkan

Tabel 1. Hasil Ekstraksi daun kakao (*Theobroma cacao* L.)

<i>Sampel</i>	Labu alas bulat		Massa Ekstrak (g)	Massa Simplisia (g)	Persen Rendemen (%)
	Bobot Kosong	Labu + Ekstrak			
<i>Daun Coklat</i> (<i>Theobroma cacao</i>)	44 g	59,1 g	15,1	200	7,55

dan masukkan kedalam chamber KLTP yang telah dijenuhkan, diamkan lempeng hingga terelusi sempurna kemudian keringkan dan diamati dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Ditandai pita yang nampak dan lakukan pengerokan. Selanjutnya dilarutkan dengan pelarut organik yang sesuai, lalu dimasukkan kedalam vial (Syarifuddin, 2021).

Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis

Hasil pengerokan sampel KLTP daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge, kemudian ditambahkan etanol Pa sebanyak 10 mL dan dihomogenkan, lalu disentrifugasi selama 15 menit menggunakan 300 rpm. Hasil sentrifugasi diambil sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan Aluminium klorida dan Sodium Sulfat sebanyak 100 µL, akuades sebanyak 3,3 mL dan dicukupkan dengan etanol Pa. Setelah itu diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 417 nm (*Theobroma cacao* L.) (Mahmud *et al.*, 2024).

HASIL

Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses untuk menarik suatu senyawa dari sampel dengan bantuan pelarut. Tahapan ini menjadi langkah awal dalam memperoleh senyawa aktif atau senyawa kimia dari suatu simplisia, serta memisahkan senyawa bioorganik alami dari zat-zat inertnya menggunakan berbagai jenis pelarut sesuai prosedur ekstraksi yang telah ditetapkan (Mun'im *et al.*, 2023).

Hasil ekstraksi daun coklat (*Theobroma cacao* L) yang dimaserasi dengan etanol selama 1x24 jam dapat dilihat pada Tabel 1. Diperoleh ekstrak kental sebanyak 1,51 gram dengan persentase rendemen 7,55% menurut standar syarat kadar air untuk ekstrak kurang dari 10% sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak rendemen daun kakao memiliki kadar air dibawah dari rentan yang telah dipersyaratkan dan memenuhi parameter kadar air ekstrak yang baik (Wiyayanti, 2025).

Tabel 2. Hasil fraksinasi daun kakao (*Theobroma cacao* L.)

Sampel	Pelarut	Hasil (g)	Nilai Rendemen (%)
Daun Coklat (<i>Theobroma cacao</i> L)	Ekstrak N-heksan	1,85	37
		0,49	9,8
	Ekstrak etil	-	-
	Ekstrak etanol klt	-	-

Fraksinasi

Fraksinasi merupakan teknik pemisahan dan pengelompokan senyawa kimia dalam ekstrak berdasarkan perbedaan kepolarannya. Proses ini melibatkan penggunaan dua atau lebih pelarut yang tidak saling tercampur (*immiscible*) dan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda, seperti air (polar) dan heksana (nonpolar) (Putri *et al.*, 2023).

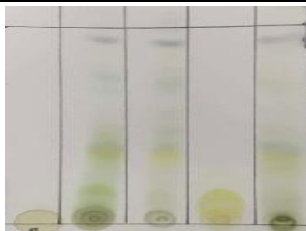
Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa kimia berdasarkan tingkat kepolarannya. Hasil fraksinasi cair-padat menggunakan pelarut N-heksan (non polar), etil asetat (semi polar), etanol (polar) dan akuades (polar), diperoleh hasil rendemen fraksi kental N-heksan dengan nilai rendemen 37% tidak memenuhi standar kadar air yang baik dan etil asetat 9,8%, memiliki kadar air kurang dari 10% sedangkan pada pelarut etanol dan akuades tidak dihasilkan fraksi akhir dikarenakan proses fraksinasi yang tidak optimal. Menurut (Wiyayanti, 2025) syarat kadar air yang baik yaitu kurang dari 10% sehingga dapat disimpulkan hasil fraksi yang memenuhi syarat hanya fraksi etil asetat. Dengan diketahuinya berat fraksi, dapat diketahui pula nilai rendemen dari setiap pelarut yang digunakan. Rendemen adalah persentase dari berat fraksi akhir dibagi dengan berat bahan awal.

Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan yang menggunakan pelat kaca atau pelat yang dilapisi dengan adsorben sebagai fase diam. Fase gerak (silika gel) bergerak dalam fase diam (N-heksan:etil asetat) dan memisahkan senyawa dari campuran berdasarkan gaya interaksi antara fase gerak dan analit dalam fase diam. Metode ini sederhana, cepat dalam kecepatan pemisahan dan sangat sensitif (Irianti *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini dilakukan analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada **Tabel 3.** menggunakan hasil fraksi dengan pelarut yang berbeda, yaitu akuades,

Tabel 3. Hasil KLT A:akuades, B:etanol, C:N-heksan, D: kuersetin, dan E: etil asetat

		
Sebelum disinari UV	UV 254 nm	UV 366 nm

etanol, n-heksan, etil asetat dan kuersetin yang digunakan sebagai senyawa pembanding karena merupakan flavonoid yang telah diketahui memiliki aktivitas biologis, terutama sebagai antioksidan dan antibakteri. Hasil Pengamatan visual terhadap pelat KLT menunjukkan bahwa fraksi etanol (B) dan fraksi etil asetat (E) memberikan jumlah dan

intensitas noda yang lebih banyak dibandingkan fraksi lainnya, khususnya setelah disinari pada panjang gelombang UV 254 nm dan UV 366 nm. Fraksi etanol menunjukkan pola fluoresensi yang serupa dengan kuersetin pada UV 366 nm, yang mengindikasikan kemungkinan keberadaan senyawa flavonoid dalam fraksi tersebut. Sebaliknya, fraksi akuades tidak menunjukkan adanya noda yang signifikan, yang dapat disebabkan oleh ketidakmampuan air dalam mengekstrak senyawa bioaktif dari sampel.

Tabel 4. Identifikasi Golongan Senyawa

Senyawa	Pereaksi	Hasil				
		Fraksi akuades	Fraksi etanol	Fraksi n-heksan	Fraksi etil asetat	Kuersetin
Alkaloid	Dragendorff	-	+	+	+	-
Steroid	Lieberman-burchard	-	+	+	+	-
Flavonoid	Aluminium klorida 5%	-	+	-	-	+
Fenol	Besi (III) klorida 5%	-	-	-	+	-
Kumarin	Kalium Hidroksida Etanolik	-	-	-	-	-

Hasil identifikasi golongan senyawa dapat dilihat pada **Tabel 4.** yang menunjukkan bahwa fraksi etanol, n-heksan, dan etil asetat mengandung alkaloid dan steroid, menandakan ketiganya efektif mengekstraksi senyawa semi-polar hingga non-polar dengan aktivitas biologis. Flavonoid hanya terdeteksi pada fraksi etanol, sesuai hasil KLT yang mirip

kuersetin, sementara fenol hanya ada di fraksi etil asetat, dan kumarin tidak terdeteksi. Etanol paling efektif mengekstraksi senyawa polar hingga semi-polar, N-heksan untuk senyawa non-polar, dan etil asetat untuk senyawa fenolik.

Nilai Rf dihitung dari perbandingan jarak tempuh solut dengan pelarut, mencerminkan retensi senyawa terhadap fase diam. Hasil pengukuran nilai Rf Pada UV 254 nm, fraksi aquades tidak menunjukkan Rf, menandakan tidak adanya senyawa terdeteksi. Pada UV 254 nm, fraksi aquades tidak menunjukkan Rf, menandakan tidak adanya senyawa terdeteksi. Fraksi etanol menghasilkan lima noda (Rf: 0,21; 0,41; 0,5; 0,81; 0,98), N-heksan tiga noda (Rf: 0,4; 0,7; 0,96), dan etil asetat tiga noda (Rf: 0,4; 0,76; 0,98). Kuersetin sebagai pembanding memiliki dua Rf: 0,2 dan 0,31. Pada UV 366 nm, fraksi aquades tetap tidak menunjukkan nilai Rf, menandakan ketiadaan senyawa berfluoresensi. Fraksi etanol menghasilkan dua noda (Rf: 0,2 dan 0,41), N-heksan satu noda (Rf: 0,4), dan etil asetat satu noda (Rf: 0,16). Kuersetin tidak menunjukkan noda dalam kondisi ini. Data ini menunjukkan bahwa etanol dan etil asetat mampu mengekstraksi lebih banyak senyawa aktif, terlihat dari variasi dan jumlah nilai Rf yang beragam, mencerminkan keberadaan senyawa dengan karakter kimia berbeda untuk identifikasi senyawa bioaktif.

Dari hasil pengamatan diperoleh nilai Rf yang baik pada pengamatan sinar UV 254,

Fraksi etanol yang dikatakan baik pada tiga nilai Rf yaitu (Rf: 0,21; 0,41; 0,5), pada fraksi N-heksan dua nilai Rf yaitu (Rf: 0,4; 0,7). Fraksi etil asetat dua nilai Rf yaitu (Rf: 0,4; 0,76). Dan pambanding kuersetin nilai Rf yaitu (Rf: 0,2; 0,31) Namun pada pengamatan sinar UV 366, Fraksi etanol dikatakan pada dua nilai Rf yaitu (Rf: 0,2; 0,41), N-heksan nilai Rf (Rf: 0,4) dan pada Fraksi etil asetat nilai Rf (Rf: 0,16). yang dinyatakan baik. Hal ini sejalan dengan literatur menurut (Wiyayanti, 2025) yang menyatakan bahwa rentang nilai Rf (*factor retention*) yang baik yaitu pada rentang 0,2-0,8.

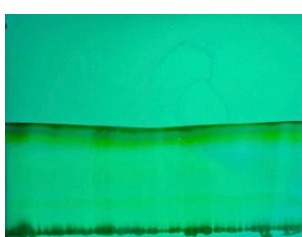
Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) digunakan untuk memisahkan senyawa tunggal dari fraksi aktif secara biologis, berdasarkan perbedaan daya serap, partisi, dan kelarutan terhadap eluen. Tiap senyawa bergerak dengan kecepatan berbeda sesuai interaksinya dengan adsorben, memungkinkan pemisahan. (Wiyayanti, 2025).

Tabel 5. Hasil Penampakan Eluen KLTP Fraksi Etil Asetat



Setelah eluen naik



UV 254 nm



UV 366 nm

Pengamatan plat KLTP fraksi etil asetat dilakukan setelah eluen naik, menggunakan cahaya tampak, UV 254 nm, dan UV 366 nm untuk mengidentifikasi senyawa berdasarkan tampilan visual dan fluoresensinya, sebagai indikasi awal keberagaman senyawa dalam fraksi. fraksi yang diuji. Hasil Pengamatan pada plat KLTP dapat dilihat pada **Tabel 5**. Dimana fraksi etil asetat menunjukkan beberapa noda pada cahaya tampak, dengan noda hijau pudar pada pita I bagian atas mengindikasikan adanya senyawa steroid, dan pita II warna noda kuning pucat menunjukkan senyawa flavonoid. pengamatan pada UV 254 nm terdapat penampakan noda pada pita I berwarna hijau gelap, yang menandakan adanya senyawa steroid, pada pita II nampak noda berwarna biru kehitaman menandakan adanya senyawa fenol dan noda berwarna kuning pucat pada pita III, plat menunjukkan adanya senyawa flavanoid. Hal ini mengindikasikan keberadaan senyawa dengan struktur konjugasi, seperti senyawa aromatik. Pengamatan pada UV 366 nm memperlihatkan bercak terang fluoresen, yang merupakan karakteristik kumarin. Variasi bercak dari segi warna dan posisi menunjukkan bahwa fraksi mengandung senyawa dengan sifat kimia yang beragam. Hasil ini menegaskan bahwa metode KLTP efektif untuk memisahkan dan mendeteksi senyawa berdasarkan polaritas dan sifat fluoresensinya. Sebagai langkah lanjut, noda flavonoid yang teridentifikasi pada pita II dikerok dan dari senyawa fenolik, flavonoid, atau dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis (300–600 nm) dengan kuersetin sebagai pambanding, untuk mengetahui kadar total flavonoid dalam fraksi secara kuantitatif.

Pengukuran nilai Rf bertujuan untuk mengetahui seberapa jauh suatu senyawa bergerak relatif terhadap pelarut yang digunakan. Hasil penampakan eluen pada plat KLTP menggunakan fraksi etil etil asetat daun kakao (*Theobroma cacao* L.) UV 254 nm

didapatkan lima noda dengan nilai Rf yaitu (Rf: 0,16; 0,3; 0,48; 0,52; 0,54) dan UV 366 nm terdapat enam noda nilai Rf yaitu (Rf: 0,44; 0,46; 0,5; 0,53; 0,54; 0,56). Maka dapat disimpulkan nilai Rf yang didapatkan masih dalam rentang nilai Rf yang baik tidak lebih dari 0,8 dimana menurut (Wiyayanti, 2025) Rentang nilai Rf yang baik berkisar antara 0,2-0,8.

Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah metode analisis yang menggunakan sinar UV dan cahaya tampak untuk mendeteksi senyawa dengan mengukur radiasi yang diserap atau diteruskan oleh sampel. Hasilnya digunakan untuk menentukan konsentrasi, menganalisis struktur senyawa, dan mendeteksi pengotor dalam sampel (Syarifuddin, 2021).

Tabel 6. Hasil Absorbansi Kurva Baku

No.	Nama	Absorban	Conc(mg/L)
1	Blanko	0,000	0,0000
2	Baku kuersetin	0,185	2,0000
3	Baku kuersetin	0,330	4,0000
4	Baku kuersetin	0,554	6,0000
5	Baku kuersetin	0,750	8,0000
6	Baku kuersetin	0,855	10,000

Penetapan kadar flavonoid total pada sampel hasil kerokan pita II plat KLTP fraksi etil asetat dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis (300–600 nm), menggunakan kuersetin sebagai standar. Kuersetin dipilih karena merupakan salah satu flavonoid yang juga ada dalam kalamansi. Penambahan Aluminium Klorida dan natrium sulfat membentuk kompleks dengan kuersetin, menyebabkan pergeseran panjang gelombang ke daerah tampak, ditandai dengan warna kuning.

Tabel 7. Hasil Pengukuran Absorbansi Senyawa Flavonoid Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.)

No	sampel	Absorban
1	Daun kakao r1	0,119
2	Daun kakao r2	0,170
3	Daun kakao r3	0,169

Absorbansi diukur pada panjang gelombang 417 nm, dengan nilai baku kuersetin berkisar dari 0,000 hingga 0,855. Pengukuran sampel diulang tiga kali, menghasilkan absorbansi 0,119; 0,170; dan 0,169 pada konsentrasi 2 ppm. Kadar flavonoid total dihitung dalam kuersetin

Equivalent (QE), dan hasil menunjukkan bahwa sampel 1 mg/mL mengandung flavonoid sebesar 9,474 mg/mL QE. Kesimpulannya, daun kakao positif mengandung flavonoid.

Penetapan kadar flavonoid total pada sampel hasil kerokan pita II plat KLTP fraksi

etil asetat dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis (300–600 nm), menggunakan kuersetin sebagai standar. Kuersetin dipilih karena merupakan salah satu flavonoid yang juga ada dalam kalamansi. Penambahan Aluminium Klorida dan Natrium Sulfat membentuk kompleks dengan kuersetin, menyebabkan pergeseran panjang gelombang ke daerah tampak, ditandai dengan warna kuning.

Absorbansi diukur pada panjang gelombang 417 nm, dengan nilai baku kuersetin berkisar dari 0,000 hingga 0,855. Pengukuran sampel diulang tiga kali, menghasilkan absorbansi 0,119; 0,170; dan 0,169 pada konsentrasi 2 ppm. Kadar flavonoid total dihitung dalam *Quercetin Equivalent* (QE), dan hasil menunjukkan bahwa sampel 1 mg/mL mengandung flavonoid sebesar 9,474 mg/mL QE. Hasil yang diperoleh berbeda dengan literatur menurut (Mahmud, 2024) kadar senyawa flavanoid daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat diukur dengan spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang maksimum 430 nm yang memperoleh kadar flavanoid total daun kakao (*Theobroma cacao* L.) sebesar 38,343 mg/mL QE dimana dapat disimpulkan bahwa kadar flavanoid total pada (*Theobroma cacao* L.) dapat bervariasi tergantung pada varietas tumbuhan, kondisi lingkungan dan metode ekstraksi yang digunakan.

KESIMPULAN

Penelitian ini mengkonfirmasi bahwa daun kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung berbagai senyawa bioaktif, termasuk flavonoid, fenol, alkaloid, dan steroid. Fraksi etanol dan etil asetat menunjukkan kandungan flavonoid dan fenol yang signifikan, dengan kadar flavonoid total tertinggi pada fraksi etil asetat (9,474 mg/mL QE). Analisis KLT mengungkap pola fluoresensi yang mirip kuersetin pada fraksi etanol, sementara fraksi N-heksan efektif mengekstrak senyawa non-polar seperti alkaloid dan steroid. Hasil ini menunjukkan bahwa daun kakao berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif alami, terutama flavonoid, yang dapat dimanfaatkan dalam pengembangan obat atau suplemen kesehatan. Optimasi proses fraksinasi diperlukan untuk meningkatkan rendemen ekstraksi senyawa polar seperti pada fraksi etanol dan akuades.

DAFTAR RUJUKAN

- Arisanti IP, Yamasari Y. Mengenali Jenis Tanaman Obat Berbasis Pola Citra Daun Dengan Algoritma K-Nearest Neighbors. *Journal of Informatics and Computer Science*. 2021;03.
- Ilma Indah Savira N, Azizah Nurfadhilah F, Aprilya Hariani S, Irsyad Maulana A, Wulandari A. Phytochemical Profiling of Ethanol Extract from Cocoa Leaves (*Theobroma Cacao* L.) using Gas Chromatography-Mass Spectrometry Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menggunakan Gass Chromatography Mass Spectrometry. *LenteraBio*. 2024;13:377-381. <https://journal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio/index>
- Ahmad J, Ramli U, Yuli AS. *Etnobotani Tumbuhan Obat Masyarakat Etnis*. Deepublish Digital; 2024.
- Kowalska T, Sajewicz M. Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals—Its Versatile Potential and Selected Applications. *Molecules*. 2022;27(19). doi:10.3390/molecules27196607
- Maqfirah Z, Muhammad AN, M. Pandapotan N, Haris MN. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan n-heksan pada daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan metode spektrofotometri uv-vis. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND SCIENCES*. 2023;6.
- Wardana IMW, Pramitha DAI, Wibawa AAC, Sanjiwani NMS. Penentuan Jenis Senyawa

- Flavonoid pada Isolat Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam Fraksi N-butanol dengan Aktivitas Antioksidan Tertinggi menggunakan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *Chimica et Natura Acta*. 2024;12(2):98-105. doi:10.24198/cna.v12.n2.48577
- Abdullah SS, Djide N, Natsir S. KLT Bioautografi Hasil Partisi Ekstrak Etanol Herba Bandotan (*Ageratum Conyzoides* L.) Terhadap *Shigella Dysentriae*. *CHEMISTRY PROGRESS*. 2021;14(1). doi:10.35799/cp.14.1.2021.34076
- Syarifuddin & Y. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak N-Butanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Secara Spektrofotometri Infra Merah. *Fito Medicine : Journal Pharmacy and S*. 2021;12. <http://journal.unpacti.ac.id/index.php/fito>
- Mun'im A, Islamudin ahmad. *Aplikasi Teknik Ekstraksi Hijau Pada Pengembangan Obat Herbal*. (Mun'im A, Islamudin ahmad, eds.). Deepublish digital; 2023.
- Wiyayanti R. *Profil Metabolit Sekunder Daun Pandan Wangi Dan Aktivitasnya Sebagai Antihiperqlikemia*. PT Nasya expanding management; 2025.
- Putri D, Trimulyono G. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*. 2023;12(2):172-178. doi:10.26740/lenterabio.v12n2.p172-178
- Irianti TT, Kuswandi S, Nuranto P. *Antioksidan Dan Kesehatan*. Gadjah Mada University Press ; 2021.
- Mahmud NF, MS, SA. Analisis Kadar Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Etanol Daun Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Dengan Perbandingan Daerah Tempat Tumbuh. *Makassar Pharmaceutical Science Journal*. 2024;2(2):326-335. <https://journal.farmasi.umi.ac.id/index.php/mpsj>