

## Kadar Total Fenolik dan Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Haiyul Fadhli,<sup>1\*</sup> Vina Dea Septi Anggreini,<sup>1</sup> & Sri Ainun<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru, Riau - Indonesia

Corresponding author: [haiyulfadhli@stifar-riau.ac.id](mailto:haiyulfadhli@stifar-riau.ac.id)

### Article history

Received: 06 June 2024

Received in revised form: 18 June 2024

Accepted: 26 June 2024

DOI:

10.17977/um0260v8i12024p026

### Kata-kata kunci:

Antioksidan,

Ekstrak etanol,

Daun Kakao (*Theobroma cacao L.*),

Kadar total fenolik

### Abstrak

Kakao (*Theobroma cacao L.*) kaya akan senyawa fenolik dan flavonoid yang bertindak sebagai antioksidan alami. Penelitian ini difokuskan pada analisis kadar total fenolik dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak etanol daun kakao. Daun kakao diekstraksi menggunakan etanol, kemudian kadar total fenoliknya diukur dengan metode kolorimetri Folin-Ciocalteu. Aktivitas antioksidannya diuji menggunakan metode DPPH dan dibandingkan dengan vitamin C sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kakao mengandung  $69.608 \pm 1.699$  mg GAE/g total fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $35,647 \mu\text{g/mL}$ .

### Abstract

Cocoa (*Theobroma cacao L.*) is rich in phenolic compounds and flavonoids that act as natural antioxidants. This study focused on analyzing the total phenolic content and antioxidant activity in the ethanol extract of cocoa leaves. Cocoa leaves were extracted using ethanol, then the total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu colorimetric method. The antioxidant activity was tested using DPPH method and compared with vitamin C as positive control. The results showed that the ethanol extract of cocoa leaves contained  $69,608 \pm 1,699$  mg GAE/g total phenolic and had strong antioxidant activity with an  $IC_{50}$  value of  $35,647 \mu\text{g/mL}$ .

### PENDAHULUAN

Antioksidan bagaikan pelindung tangguh bagi sel-sel tubuh kita. Molekul-molekul ini mampu menghambat atau menetralkan radikal bebas, mencegah stres oksidatif dan kerusakan seluler yang dapat berakibat fatal (Frei, 2012). Senyawa fenolik, yang merupakan metabolit sekunder yang ditemukan dalam tumbuhan, memberikan kontribusi signifikan terhadap aktivitas antioksidan mereka [30][34]. Kakao kaya senyawa bioaktif seperti fenolat dan flavonoid yang bertindak sebagai antioksidan [17]. Daunnya pun mengandung theobromine, kafein, antosianin, leucoanthochianin, dan katekol [13].

*Theobroma cacao L.* adalah salah satu tanaman dalam keluarga Sterculiaceae [31]. Berbagai

penelitian menunjukkan bahwa kakao secara tradisional dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, seperti seperti radang, kanker, disfungsi kardiovaskular, jantung koroner, antimikroba dan antivirus [2].

Kulit buah kakao, baik yang masak maupun muda, memiliki kandungan antioksidan yang bervariasi. Hal ini dibuktikan dengan nilai  $IC_{50}$  yang berbeda untuk setiap ekstrak dan fraksi. Pada kulit buah kakao masak, nilai  $IC_{50}$  tertinggi dimiliki oleh fraksi etil asetat (0,9 ppm), menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling kuat. Sementara itu, nilai  $IC_{50}$  terendah dimiliki oleh fraksi n-heksan (126,2 ppm). Hal serupa juga terjadi pada kulit buah kakao muda, dengan fraksi etil asetat yang memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 9,3 ppm dan fraksi n-heksan yang memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 209,8 ppm [15].

Krim ekstrak kulit buah kakao memiliki kekuatan antioksidan yang luar biasa, terbukti dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 0,08 mg/mL. Angka ini menunjukkan bahwa ekstrak pada krim tersebut mampu menetralkan radikal bebas dengan sangat efektif, bahkan pada konsentrasi yang rendah [14].

Ekstrak etanol dari daun *Theobroma cacao* sangat menarik untuk studi antioksidan karena kelarutannya yang tinggi dan efisiensi ekstraksi senyawa fenolik [32]. Mempelajari aktivitas antioksidan dan kandungan fenolik dalam ekstrak ini bukan hanya membuka potensi manfaat kesehatannya, tetapi juga mampu meningkatkan nilai produk sampingan kakao, membuka peluang penggunaannya dalam makanan fungsional, nutrasetikal, dan farmasi [26-27].

Penelitian ini mengkaji aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik daun *Theobroma cacao* yang diekstrak menggunakan etanol, dengan menggunakan uji standar seperti DPPH untuk aktivitas antioksidan, dan metode Folin-Ciocalteu untuk kandungan fenolik. Penelitian kedepannya diharapkan dapat berkontribusi pada pengembangan formulasi antioksidan alami dan meningkatkan pemanfaatan daun kakao dalam berbagai aplikasi terkait kesehatan.

Selain itu, minimnya informasi penelitian tentang aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kakao (*Theobroma cacao* L.) yang berasal dari Pekanbaru. Hal ini mendorong peneliti untuk melakukan penelitian baru dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) untuk mengungkap potensi antioksidan daun kakao.

## METODE

### Pengambilan dan Persiapan Sampel

Daun kakao tua (*Theobroma cacao* L.) segar dikumpulkan dari Jalan Melati, Binawidya, Kecamatan Binawidya, Kota Pekanbaru, Riau. Daun kakao dibersihkan dan dirajang, kemudian dikeringkan menggunakan oven.

### Skrining Fitokimia Sampel Segar

Lima gram daun kakao diiris kecil dan direndam dalam 5 mL etanol selama 15 menit dengan pemanasan langsung. Campuran kemudian disaring, dan filtratnya dipindahkan ke tabung reaksi baru. Pelarut diuapkan, dan ditambahkan 5 mL campuran aquades dan kloroform (1:1). Campuran dikocok kuat dan didiamkan hingga

terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan atas (air) digunakan untuk pengujian fenolik, flavonoid, dan saponin, sedangkan lapisan bawah (kloroform) digunakan untuk pengujian terpenoid dan steroid [19].

### Uji Fenolik

Lapisan air diteteskan ke plat tetes. Kemudian, ditambahkan 1-2 tetes larutan besi (III) klorida 1%. Munculnya warna hijau kehitaman atau biru tua pada sampel menunjukkan adanya senyawa fenolik.

### Uji Flavonoid

Sedikit lapisan air diteteskan ke lubang plat tetes. Selanjutnya, 1-2 butir logam magnesium (Merck®) ditambahkan diikuti dengan beberapa tetes asam klorida pekat (Merck®). Perubahan warna jingga hingga merah pada sampel mengindikasikan keberadaan senyawa flavonoid.

### Uji Saponin

Lapisan air dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kocok tabung dengan kuat selama beberapa detik. Amati apakah terbentuk busa pada permukaan air. Jika busa yang terbentuk tahan selama 5 menit atau lebih, maka mengandung senyawa saponin.

### Uji Terpenoid dan Steroid

Lapisan kloroform disaring menggunakan pipet tetes yang berisi norit dan kapas. Filtrat yang diperoleh kemudian diteteskan sebanyak 2-3 tetes ke dalam 3 lubang plat tetes dan dibiarkan mengering. Setelah kering, ke lubang 1 ditambahkan asam asetat anhidrat, ke lubang 2 ditambahkan asam sulfat pekat, dan ke lubang 3 ditambahkan pereaksi Liebermann Burchard (campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Munculnya warna merah pada lubang 1 menunjukkan adanya senyawa terpenoid. Warna hijau sampai biru pada lubang 2 dan 3 menunjukkan adanya senyawa steroid.

### Uji Alkaloid

Daun kakao seberat 5 gram dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam lumpang. Pasir ditambahkan dan daun kakao digerus hingga halus. Kloroform sebanyak 10 ml dituangkan dan campuran digerus kembali. Kloroform-amoniak 0,05 M sebanyak 10 ml ditambahkan dan campuran digerus kembali. Campuran disaring dengan kapas menggunakan pipet dan dipindahkan ke tabung reaksi. Satu mililiter asam sulfat 2 N ditambahkan

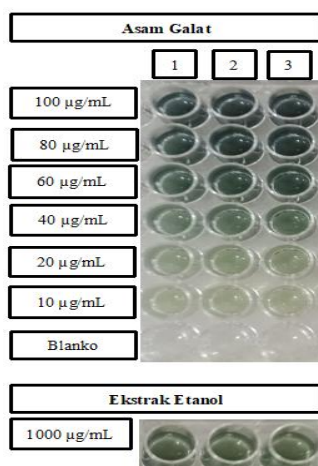
ke dalam filtrat dan diaduk selama 2 menit. Diamkan campuran hingga terbentuk dua lapisan. Ambil lapisan asam dan tambahkan 1-2 tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid dalam daun kakao [11].

### Ekstraksi Sampel

Serbuk simplisia daun kakao dimaserasi dengan etanol destilasi dalam perbandingan 1:4 (b/v) selama 3 hari, diulang 3 kali. Filtrat yang dihasilkan dipisahkan dari ampas dan kemudian dievaporasi menggunakan rotary vacuum evaporator [23].

### Uji Penetapan Kadar Total Fenolik

Timbang 10 mg ekstrak etanol daun kakao kemudian dilarutkan dalam etanol hingga mencapai volume 10 mL (1000 µg/mL). Sebanyak 100 µL larutan ini kemudian dipipet ke dalam sumur microplate. Selanjutnya, 75 µL pereaksi Folin-Ciocalteu (Supelco®) 0,2 N ditambahkan dan campuran dibiarkan selama 8 menit. Kemudian, 60 µL NaOH (Merck®) 1% ditambahkan dan campuran diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang tanpa terpapar sinar matahari. Setelah inkubasi, absorbansi campuran diukur dengan microplate reader (Epoch Biotech®) pada panjang gelombang 760 nm sebanyak tiga kali (Gambar 1). Asam galat (Sigma Aldrich®) digunakan sebagai standar untuk membuat kurva kalibrasi, yang kemudian digunakan untuk menghitung kandungan fenolik dalam sampel daun kakao [33].



Gambar 1. Pengujian Larutan Standar Asam Galat dan Ekstrak Etanol Daun Kakao

### Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kakao dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-

picrylhydrazyl) yang dimodifikasi dilakukan menggunakan alat microplate reader (Rokhim et al., 2019). Larutan uji ekstrak etanol daun kakao dibuat dalam seri konsentrasi 125; 62,5; 31,25 µg/mL dari dan larutan uji asam askorbat (Brataco®) pada konsentrasi 25; 12,5; dan 6,25 µg/mL. Masing-masing 50 µL larutan uji ekstrak etanol daun kakao dan larutan uji asam askorbat dipipet dan dimasukkan ke dalam sumur baris 96 well microplate. Kemudian, 80 µL DPPH (Sigma Aldrich®) 80 µg/mL ditambahkan ke dalam setiap sumur. Sumur lain diisi dengan metanol sebagai blanko. 96 well microplate diinkubasi selama 30 menit dan ditutup untuk memastikan reaksi berlangsung sempurna. Setelah inkubasi, absorbansi larutan pada setiap sumur diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan microplate reader [7].

### Analisis Data

Pengolahan dan penyajian hasil penelitian dilakukan dalam bentuk grafik dan tabel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Skrining Fitokimia

Ekstrak kental daun kakao diperiksa secara kualitatif menggunakan metode skrining fitokimia untuk mengidentifikasi senyawa fitokimia metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya.

Tabel 1. Hasil Uji Skrining Fitokimia Daun Kakao

Metabolit Sekunder	Hasil Pengamatan
Alkaloid	(-)
Flavonoid	(+)
Fenolik	(+)
Saponin	(-)
Terpenoid	(-)
Steroid	(-)

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kakao mengandung fenolik dan flavonoid, tetapi tidak mengandung alkaloid, saponin, terpenoid, maupun steroid [11]. Kehadiran flavonoid dan fenolik ini mendukung potensi aktivitas antioksidan dari ekstrak daun kakao [34].

### Penyiapan Sampel

Daun segar dilakukan sortasi basah, pencucian, pengeringan dalam oven, dan penghalusan setelah

sampel terkumpul. Sortasi basah bertujuan agar sampel terpisahkan dari pengotor yang dikhawatirkan masih tersisa sehingga daun kakao yang akan digunakan bebas dari kontaminasi bahan lain yang bukan bagian dari daun kakao. Selanjutnya daun kakao dikeringkan dengan oven selama 3-5 hari sampai kering dengan suhu 50°C. Tujuan dilakukan pengeringan agar kandungan air didalam sampel berkurang sehingga dapat menghentikan proses enzimatik yang memungkinkan untuk terjadinya penguraian senyawa aktif sehingga sampel yang kita dapatkan awet, tidak rusak serta dapat digunakan atau disimpan dalam jangka waktu yang relatif lama [10].

Saat membuat simplisila, dilakukan langkah penting yaitu penghalusan. Tujuannya untuk memperluas permukaan partikel simplisila. Semakin luas permukaannya, semakin besar pula kontak antara partikel simplisila dengan pelarut. Hal ini mempermudah larutan untuk masuk ke dalam simplisila dan melarutkan senyawa yang terkandung di dalamnya. Namun, proses penghalusan tidak boleh berlebihan karena dapat menyulitkan penyaringan dan menghasilkan simplisila yang tercampur dengan partikel halus [35].

### Ekstraksi

Senyawa antioksidan dari tanaman diekstraksi dengan metode maserasi. Metode ini melibatkan pencampuran serbuk tanaman dengan pelarut etanol dalam wadah tertutup rapat dan merendamnya pada suhu kamar. Proses maserasi ini dilakukan di dalam botol berwarna gelap untuk menghindari paparan cahaya. Metode ini dipilih karena menghasilkan ekstrak antioksidan lebih tinggi dan lebih cepat dibandingkan metode lain. Pertama, simplisila atau serbuk tanaman direndam dalam pelarut etanol. Proses ekstraksi diulang sebanyak 3 kali selama 9 hari untuk mendapatkan hasil yang maksimal [4].

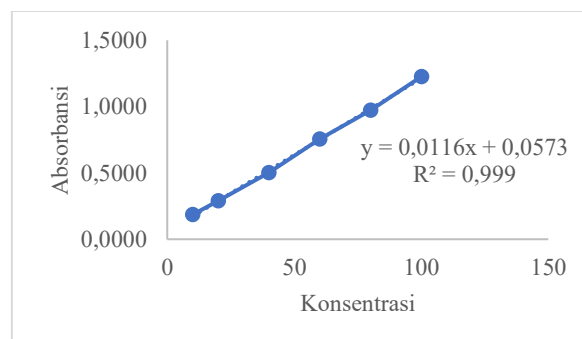
Setelah proses ekstraksi selesai, ekstrak cair yang dihasilkan dipisahkan menggunakan alat rotary evaporator. Proses pemekatan ini dilakukan pada suhu rendah, sekitar 40-50°C. Hasil pemekatan ini menghasilkan ekstrak etanol dari 100gram simplisila dengan berat 20,614 gram. Persentase rendemen ekstrak etanol ini adalah 20,61%.

### Uji Penetapan Kadar Total Fenolik

Senyawa fenolik dikenal karena kemampuannya untuk mendonorkan elektron atau

atom hidrogen, menjadikannya penangkap radikal yang efektif. Kandungan senyawa fenolik total (KTFe) dalam ekstrak tumbuhan umumnya ditentukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Reagen ini bereaksi dengan senyawa fenolik, menghasilkan perubahan warna yang dapat diukur dengan alat spektrofotometer. Hasil pengukuran KTFe biasanya dinyatakan dalam satuan ekivalen asam galat (GAE). Sedangkan aktivitas antioksidan ekstrak tumbuhan dapat diuji dengan metode seperti 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), yang mengukur kemampuannya dalam menstabilkan radikal bebas.

Kadar fenolik total dalam ekstrak diukur dengan metode Folin-Ciocalteu yang dipilih karena kemampuannya menghasilkan larutan berwarna dari reaksi dengan senyawa fenolik. Setelah proses ekstraksi selesai, kadar total fenolik dalam ekstrak diukur menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Metode ini dipilih karena pereaksi Folin-Ciocalteu dapat bereaksi dengan senyawa fenolik menghasilkan larutan berwarna yang absorbansinya dapat diukur. Metode ini mengukur kadar sampel berdasarkan pembentukan senyawa kompleks berwarna biru yang dapat dideteksi pada 760 nm. [29].



Gambar 2. Pembuatan Kurva Larutan Standar

Asam galat, turunan asam hidroksi benzoat yang tergolong asam fenolat sederhana, dijadikan standar untuk mengukur kadar total fenolik [3]. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi asam galat yang diperoleh yaitu  $y = 0,0116x + 0,0573$  dengan nilai  $R^2 = 0,999$  (Gambar 2). Koefisien korelasi ( $R^2$ ) yang mendekati 1 menunjukkan hubungan yang sangat kuat antara dua variabel. Pada penelitian ini,  $R^2 = 0,999$  menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang hampir sempurna antara konsentrasi asam galat dan absorbansi [24]. Keterkaitan antara kadar fenolik dan intensitas warna biru serta absorbansi dapat dibuktikan dengan

semakin pekatnya warna biru dan meningkatnya absorbansi seiring dengan meningkatnya kadar fenolik (Turrisman *et al.*, 2012). Melalui persamaan yang digunakan, diketahui bahwa kadar total fenolik dalam ekstrak etanol daun kakao mencapai  $69,608 \pm 1,699$  mgGAE/g ekstrak (**Tabel 1**).

**Tabel 1.** Hasil Penetapan Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol Daun Kakao

Replikasi	Abs. Sampel	KTFe (mgGAE/g)	Rata-rata KTFe $\pm$ SD (mgGAE/g)
1	0,824	68,627	$69,608 \pm 1,699$
2	0,852	71,569	
3	0,822	68,627	

Kandungan fenolik yang tinggi pada daun kakao, seperti yang ditunjukkan oleh penelitian lainnya, berkontribusi pada aktivitas antioksidan yang kuat (Singleton *et al.*, 1999). Sifat antioksidan ini dikaitkan dengan kemampuan senyawa fenolik untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah oksidasi lipid, memberikan manfaat kesehatan yang potensial (Azizah *et al.*, 2014; Devitria *et al.*, 2022; Setiabudi *et al.*, 2020).

### Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan banyak dilakukan dengan microplate reader karena alat ini memungkinkan pengujian banyak sampel sekaligus, menghemat waktu, dan meminimalkan jumlah sampel yang diperlukan. Dalam metode ini, larutan DPPH berperan sebagai radikal bebas yang bereaksi dengan senyawa antioksidan. Aktivitas antioksidan sampel menyebabkan perubahan warna larutan DPPH dalam metanol, dari ungu tua menjadi kuning pucat. Hal ini terjadi karena DPPH telah tereduksi menjadi bentuk 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H) (Molyneux, 2004).

Sebelum pengukuran absorbansi, larutan sampel diinkubasi selama 30 menit untuk memastikan reaksi sempurna antara senyawa dalam ekstrak dan radikal bebas DPPH. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Panjang gelombang ini dipilih karena larutan DPPH menunjukkan serapan maksimal pada panjang gelombang tersebut. Serapan ini akan menurun secara stoikiometri ketika elektron DPPH berpasangan (Handayani *et al.*, 2014).

**Tabel 2.** Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kakao

Sampel	Kons ( $\mu$ g/mL)	Ln Kons	% Inhibisi	Kurva Kalibrasi	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
E. etanol	125	4,828	84,78	$y = 30,794x$	3,647
	62,5	4,135	74,97	-	
	31,25	3,442	42,10	$R^2 = 0,9113$	
Vit. C	25	3,219	73,61	$y = 26,991x$	10,355
	12,5	2,526	55,45	-	
	6,25	1,833	36,20	$R^2 = 0,9997$	

Nilai IC<sub>50</sub>, yang menunjukkan kekuatan aktivitas antioksidan, diperoleh dari persamaan regresi linear dengan mengganti nilai persentase inhibisi menjadi 50% (Manongkoa *et al.*, 2020). Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub>, semakin kuat aktivitas antioksidannya. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kakao menunjukkan potensi antioksidan yang kuat dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 35.647  $\mu$ g/mL (**Tabel 2**), mendekati efektivitas vitamin C (Brand-Williams *et al.*, 1995). Aktivitas antioksidan yang kuat ini menunjukkan bahwa daun kakao dapat menjadi sumber antioksidan alami yang potensial untuk digunakan dalam aplikasi kesehatan (Martinez-Lopez *et al.*, 2014). Kandungan senyawa fenolik yang tinggi dalam ekstrak ini mendukung potensinya sebagai sumber antioksidan alami untuk aplikasi kesehatan (Sayuti & Yenrina, 2015).

Senyawa fenolik dalam tumbuhan berkontribusi terhadap aktivitas antioksidannya. Diharapkan, tumbuhan dengan kandungan fenolik tinggi juga memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Semakin tinggi kadar fenolik dalam ekstrak tumbuhan, semakin tinggi pula efek antioksidannya (Alim *et al.*, 2022). Beberapa penelitian lain juga menunjukkan hubungan erat antara konsentrasi senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan dalam sampel. Hubungan ini dilandasi oleh mekanisme kerja senyawa fenolik, di mana kemampuannya menyumbangkan atom hidrogen kepada radikal bebas berbanding lurus dengan kandungan fenoliknya (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Kekuatan hubungan antara kadar fenolik, persen inhibisi, dan aktivitas antioksidan dapat bervariasi. Faktor-faktor yang memengaruhi hal ini meliputi jenis dan struktur senyawa fenolik, jenis radikal bebas yang dinetralkan, serta kondisi pengujian untuk mengukur aktivitas antioksidan.

Korelasi positif antara kadar fenolik, persen inhibisi, dan aktivitas antioksidan membuka peluang penting dalam pengembangan antioksidan alami dan makanan fungsional [20]. Dengan memahami hubungan ini, para peneliti dapat memilih dan mengoptimalkan sumber tanaman dengan kandungan fenolik tinggi untuk memaksimalkan manfaat kesehatannya.

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun kakao mengandung  $69.608 \pm 1.699$  mg GAE/g total fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 35,647  $\mu$ g/mL.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Alim, N., Hasan, T., Rusman, R., Jasmiadi, J. & Zulfritri, Z. 2022. Phytochemical Screening, Relationship of Total Phenolic with Antioxidant Activity Of Ethanol and Methanol Extracts of Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Oken) Bark. *Jurnal Ilmiah Sains*, 22(2): 118–124.
- [2] Arifin, B. & Ibrahim, S. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1): 21–29.
- [3] Azizah, D.N., Kumolowati, E. & Faramayuda, F. 2014. Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl<sub>3</sub> pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2): 45–49.
- [4] Badaring, D.R., Sari, S.P.M., Nurhabiba, S., Wulan, W. & Lembang, S.A.R. 2020. Uji Ekstrak Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Indonesian Journal of Fundamental Sciences*, 6(1): 16.
- [5] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. & Berset, C. 1995. Use of A Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1): 25–30.
- [6] Devitria, R., Juariah, S. & Putri, L. 2022. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Biji Jambu Bol (*Syzygium malaccense* L) Dengan Metode DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhidrazil). *Klinikal Sains: Jurnal Analis Kesehatan*, 10(1): 45–52.
- [7] Fadhli, H., Nurdin, A.N. & Octaviani, M. 2019. Potensi Antioksidan dari Ekstrak Kulit Batang Bauhinia semibifida Roxb. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 4(1): 77–87.
- [8] Frei, B. 2012. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. California: Academic Press.
- [9] Handayani, V., Ahmad, A.R. & Sudir, M. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (*Etlingera elatior* (Jack) RM Sm) Menggunakan Metode DPPH. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(2): 86–93.
- [10] Handoyo, D.L.Y. & Pranoto, M.E. 2020. Pengaruh Variasi Suhu Pengeringan terhadap Pembuatan Simplisia Daun Mimba (*Azadirachta indica*). *Jurnal Farmasi Tinctura*, 1(2): 45–54.
- [11] Harbone, J.. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Institusi Teknologi Bandung.
- [12] Harborne, J.. 2016. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. 2 ed. Bandung: ITB.
- [13] Hasanah, M., Amaliani, S. & Rikmasari, Y. 2017. Analisis Antioksidan dari Berbagai Fraksi Daun Cokelat (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Ilmiah Bakti Farmasi*, 2(1): 33–40.
- [14] Huda, N., Sindi, C., Kusmawan, Z.A. & Sinaga, H. 2022. Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Antioksidan. *Jurnal Biogenerasi*, 7(1): 163–170.
- [15] Jusmiati, J., Rusli, R. & Rijai, L. 2015. Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Kakao Masak dan Kulit Buah Kako Muda. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1(1): 34–39.
- [16] Manongkoa, P.S., Sangia, M.S. & Momuata, L.I. 2020. Uji Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.). *Jurnal MIPA*, 9(2): 64–69.
- [17] Maqfirah, Z., Nasution, M.A., Nasution, M.P. & Nasution, H.M. 2023. 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*, 6(4): 1534–

- 1543.
- [18] Molyneux, P. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Esmitating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 26(2): 211–219.
- [19] Mondong, F.R. 2015. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia prunifolia* Jacq.) dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L.) Herb). *Jurnal MIPA*, 4(1): 81–87.
- [20] Prior, R., Wu, X. & Kschaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290–4302.
- [21] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933–956.
- [22] Rokhim, M., Zamri, A. & Teruna, H.Y. 2019. Sintesis Dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonol 2-(3, 4, 5-Dimetoksifenil)-3-Hidroksi-4h-Kromen-4-On. *JOPS (Journal Of Pharmacy and Science)*, 2(2): 34–37.
- [23] Sani, R.N., Nisa, F.C., Andriani, R.D. & Maligan, J.M. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(2): 121–126.
- [24] Sayuti, K. & Yenrina, R. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Universitas Andalas Press.
- [25] Setiabudi, A., Pringgenies, D. & Ridlo, A. 2020. Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH dan Daya Reduksi Ekstrak *Gracilaria verrucosa*. *JRST (Jurnal Riset Sains dan Teknologi)*, 4(2): 47–55.
- [26] Shahanas, E., Panjikkaran, S.T., Aneena, E.R., Sharon, C.L. & Remya, P.R. 2019. Health Benefits of Bioactive Compounds from cocoa (*Theobroma cacao*). *Agricultural Reviews*, 40(2): 143–149.
- [27] Singh, M., Agarwal, S. & Agarwal, M. 2020. Benefits of *Theobroma cacao* and Its Phytocompounds as Cosmeceuticals. *Plant-derived Bioactives*. Springer, hal.509–521.
- [28] Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. Elsevier, hal.152–178.
- [29] Stratil, P., Kuban, V. & Fojtova, J. 2008. Comparison of The Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech J. Food Sci*, 26(4): 242–253.
- [30] Sugihartini, A. & Maryati, M. 2022. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pucuk Merah (*Syzygium myrtifolium*) dan Penetapan Kadar Fenol Total. *Usadha Journal of Pharmacy*, 1(3): 267–277.
- [31] Tjitrosoepomo, G. 1994. *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- [32] Wahidiyanti, P.J., Ikrawan, Y. & Iwansyah, C.A. 2019. Effect of Solvent on Total Phenolics Content, Antioxidant Activity and toxicity of ciplukan fruit (*Physalis angulata* L.). *Jurnal Riset Teknologi Industri*, 13(1): 70–79.
- [33] Xu, B.J. & Chang, S.K.C. 2007. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science*, 72(2): S159–S166.
- [34] Zeb, A. 2020. Concept, Mechanism, and Applications of Phenolic Antioxidants in Foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9): e13394.
- [35] Zuhro, S.H., Tutik, T. & Marcellia, S. 2021. Pengaruh Jenis Pelarut Ekstrak Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) terhadap Larva *Aedes aegypti*. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, 8(4): 367–374.