

**VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN  
MENGUNAKAN METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)  
SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS SERTA UJI AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN PADA KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH  
NANAS**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**Khoiriyah Dea Setyana**

**NPM 1817011061**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

**VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN  
MENGUNAKAN METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)  
SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS SERTA UJI AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN PADA KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH  
NANAS**

**Oleh**

**Khoiriyah Dea Setyana**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

## **ABSTRACT**

### **VALIDATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST METHOD USING FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) METHOD BY UV-VIS SPECTROFOTOMETRY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST ON COCOA POD PEELS AND PINEAPPLE PEEL**

**By**

**Khoiriyah Dea Setyana**

This study has validated the activity test method and tested the antioxidant activity of cocoa fruit peel and pineapple fruit peel. The antioxidant activity of fruit peels was evaluated using the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) method by UV-Vis Spectrophotometry at a maximum wavelength of 691 nm. The IC<sub>50</sub> value along with the estimated uncertainty of the antioxidant activity test on cocoa peel and pineapple peel samples was  $33.076 \pm 1.4480$  ppm and  $39.066 \pm 1.6702$  ppm, respectively. The comparison between the uncertainty and the test result value is 4.4% for cocoa pods and 4.3% for pineapple peels. The method validation was carried out with the parameters of precision, accuracy, linearity, limit of detection, and limit of quantitation, and the determination of measurement uncertainty value was conducted to ensure the test results. The results showed that the method used in this study meets the requirements so that it can be used for routine testing in the laboratory.

**Key words:** Antioxidants, FRAP, cocoa fruit peel, pineapple fruit peel, and UV-Vis spectrophotometry.

## ABSTRAK

### VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGUNAKAN METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH NANAS

Oleh

**Khoiriyah Dea Setyana**

Pada penelitian ini telah dilakukan validasi metode dan uji aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao dan kulit buah nanas. Aktivitas antioksidan kulit buah diuji dengan menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) secara Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 691 nm. Nilai  $IC_{50}$  beserta estimasi ketidakpastian uji aktivitas antioksidan pada sampel kulit kakao dan kulit nanas berturut-turut adalah  $33,076 \pm 1,4480$  ppm dan  $39,066 \pm 1,6702$  ppm. Perbandingan antara ketidakpastian dengan nilai hasil uji yaitu sebesar 4,4% pada kulit buah kakao dan pada kulit nanas sebesar 4,3%. Asam askorbat digunakan sebagai larutan standar. Validasi metode dilakukan dengan parameter presisi, akurasi, linearitas, limit deteksi, dan limit kuantitasi, serta penentuan nilai ketidakpastian pengukuran dilakukan untuk memastikan hasil pengujian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi persyaratan sehingga dapat digunakan untuk pengujian rutin di laboratorium.

**Kata kunci:** Antioksidan, FRAP, kulit buah kakao, kulit buah nanas, dan spektrofotometri UV-Vis.

Judul Skripsi : **VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH NANAS**

Nama Mahasiswa : **Khoiriyah Dea Setyana**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1817011061**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. Widiarto', written over the left side of the logo.

**Dr. Sonny Widiarto, M.Sc.**  
NIP 19711030 199703 1 003

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Rinawati', written over the right side of the logo.

**Rinawati, Ph.D.**  
NIP 19710414 200003 2 001

2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung**

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Mulyono', written below the text of the second approver.

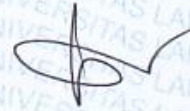
**Mulyono, Ph.D.**  
NIP 19740611 200003 1 002



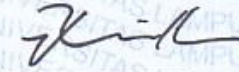
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

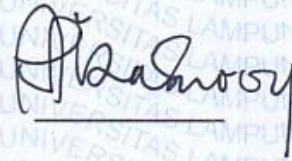
**Ketua : Dr. Sonny Widiarto, M.Sc.**



**Sekretaris : Rinawati, Ph.D.**



**Penguji  
Bukan Pembimbing : Prof. Noviany, M.Si., Ph.D.**



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**  
NIP 19711001 200501 1 002



**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 24 Mei 2023**

**LEMBAR PERNYATAAN  
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

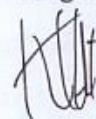
Nama : Khoiriyah Dea Setyana  
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011061  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul "**Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) Secara Spektrofotometri UV-Vis serta Uji Aktivitas Antioksidan pada Kulit Buah Kakao dan Kulit Buah Nanas**" adalah benar karya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya tidak berkeberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagai mestinya.

Bandar Lampung, 24 Mei 2023

Yang m:



Khoiriyah Dea Setyana  
NPM. 1817011061

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandarsari kecamatan Padang Ratu, Lampung tengah pada tanggal 24 Juli 1999, sebagai anak pertama dari tiga bersaudara yang merupakan putri dari pasangan Bapak Sutrianto dan Ibu Suharni.

Penulis mengawali jenjang pendidikan dari pendidikan taman kanak-kanak di TK Ma'arif 016 Bandarsari, Padang Ratu hingga tahun 2006 dan sekolah dasar di SDN 02 Bandarsari, Padang Ratu, Lampung Tengah hingga tahun 2012. Pendidikan sekolah menengah pertama diselesaikan pada tahun 2015 di SMPN 01 Padang Ratu, Padang Ratu, Lampung Tengah. Pendidikan sekolah menengah atas diselesaikan di SMAS Ma'arif 05 Padang Ratu, pada tahun 2018 dan pada tahun yang sama penulis diterima sebagai Mahasiswi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Pada tahun 2021 bulan Februari-Maret penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Surabaya, Kecamatan Padang Ratu, Kabupaten Lampung Tengah. Selain itu, pada bulan Juli-Agustus penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di PT. Indo *Energy Solutions* (IES). Kemudian Pada tahun 2022 penulis menyelesaikan penelitian yang dilakukan di UPT LT-SIT Universitas Lampung yang diberi judul “Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) Secara Spektrofotometri UV-Vis serta Uji Aktivitas Antioksidan pada Kulit Buah Kakao dan Kulit Buah Nanas”.



## **MOTTO**

“Apapun yang menjadi takdirmu, akan mencari jalan menemukanmu”  
(**Abi bin Abi Thalib**)

“Kamu terlahir untuk menjadi nyata bukan sempurna”  
(**Min Yoon Gi**)

“Meskipun dunia terus berputar, tidak akan ada sesuatu yang terlewati ketika kamu tidak menyelesaikannya”  
(**Penulis**)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Atas izin dan keridhoan ALLAH subhanahu wa ta'ala yang telah memberikan Rahmat dan Hidayah-Nya serta rasa syukur yang luar biasa.*

*Ku persembahkan karya sederhanaku ini sebagai wujud cinta, bakti dan sayang ku kepada:*

*Ibuku, Ibuku, Ibuku*

*Ibu Suharni, wanita terkeren dan tersabar sejagat raya.*

*Bapakkkku*

*Bapak Sutrianto, karena engkau aku belajar hidup tanpa penyesalan.*

*Semua keberuntungan berasal dari doa-doa kalian bapak ibuku.*

*Terimakasih. Aku sayang.*

*Adik-Adikku yang Kusayangi*

*Ibnu Fattah Ghani dan Ibnu Jabbar Zaidan*

*Terimakasih atas segalanya, Bismillah semoga Allah permudah langkah kalian kedepannya.*

*Kepada orang-orang yang telah mendukungku selama ini*

*Terimakasih. Aku bersyukur.*

## SANWACANA

Alhamdulillah puji syukur kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala limpahan rahmat, nikmat, dan karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul

**Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) Secara Spektrofotometri UV-Vis serta Uji Aktivitas Antioksidan pada Kulit Buah Kakao dan Kulit Buah Nanas** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan, namun itu semua dapat penulis lalui berkat rahmat dan ridho Allah Subhanahu wa ta'ala serta bantuan dan dukungan dari orang-orang terdekat penulis. Jazakumullahu khoir orang-orang baik yang telah kebersamai dan memberi banyak dukungan bagi penulis. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangannya sehingga penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang membangun. Selain itu, penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah Subhanahu wa ta'ala.
2. Kedua orang tuaku tercinta, dan adikku yang selalu memberikan dukungan baik materi maupun moral, cinta, kasih sayang, dan ketulusan, dalam membesarkanku selama ini, yang tak henti-hentinya memberikan do'a disetiap langkahku. Semoga Allah Subhanahu wa ta'ala membalas kebaikan kalian yang tidak ternilai harganya, Aamiin.
3. Bapak Dr. Sonny Widiarto, M.Sc., selaku pembimbing I yang selalu memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, semangat, saran, dan motivasi serta

kesabaran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga bapak selalu dalam lindungan Allah Subhanahu wa ta'ala dan semoga Allah Subhanahu wa ta'ala membalas semua kebaikan bapak.

4. Ibu Rinawati, Ph.D. selaku pembimbing II yang juga selalu memberikan ilmu, bimbingan, nasihat, motivasi, saran dan kesabaran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga ibu sehat selalu dan semoga Allah yang membalas semua kebaikan ibu.
5. Ibu Prof. Noviany, M.Si. Ph.D. selaku Penguji penelitian yang telah memberikan ilmu, saran, motivasi, nasihat, serta kritik yang membangun kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik. Semoga ibu sehat selalu dan semoga Allah Subhanahu wa ta'ala yang membalas semua kebaikan ibu.
6. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan nasihat kepada penulis selama kuliah di jurusan kimia.
7. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu Dosen Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik, dan memberikan ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat kepada penulis selama menempuh perkuliahan. Semoga Allah Subhanahu wa ta'ala yang membalas semua kebaikan bapak dan ibu dosen dan menjadikan pahala jariyah dari ilmu yang semoga bermanfaat bagi lingkungan.
10. Mba Farlina, S.P. beserta staff-staff UPT LT-SIT yang telah banyak membantu penulis untuk menyediakan alat dan bahan selama penelitian.
11. Seluruh laboran, staff dan karyawan FMIPA Universitas Lampung atas semua bantuannya selama ini.
12. Kepada rekan saya Kadek Fani Sugiyanti selaku tim penelitian antioksidan dan juga kepada sepupu saya Cindi Meli Stefani serta sahabat-sahabat saya Jilda Sofyana Dewi, Khairunisa, Mega Muryani, dan Wulandari yang telah



memberikan dukungan moril kepada saya. Tak lupa juga kepada anggota Tomorrow X Together, terimakasih sudah memberikan dukungan, semangat, motivasi dan keceriaan selama penelitian. Semoga selalu diberikan perlindungan dimanapun kalian nantinya.

13. Seluruh teman-teman Kimia Unila Angkatan 2018 yang luar biasa, tanpa kalian kehidupanku sebagai mahasiswi kimia bukan apa-apa. Aku bangga pada kalian, dukungan kalian tak ternilai harganya.
14. Semua pihak yang terlibat dalam penyelesaian skripsi ini, yang tidak bisa disebutkan satu persatu, jazakumullahu khoir atas semua bantuan dan dukungan secara tulus dan ikhlas dalam menyusun skripsi ini.

Akhir kata, penulis memohon maaf apabila skripsi ini masih kurang dari kesempurnaan. Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 24 Mei 2023

Penulis,

Khoiriyah Dea Setyana

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>vi</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	4
1.3 Manfaat Penelitian .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Radikal Bebas .....	5
2.2 Antioksidan .....	6
2.3 Metode FRAP .....	8
2.4 Kulit Buah .....	9
2.4.1 Kulit Buah Kakao .....	9
2.4.4. Kulit Buah Nanas .....	12
2.5 Ekstraksi.....	13
2.6 Spektrofotometri UV-Vis.....	14
2.7 Validasi Metode .....	20
2.7.1. Presisi.....	20
2.7.2. Akurasi.....	22
2.7.3. Linearitas.....	23
2.7.4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi .....	24
2.8 Ketidakpastian Pengukuran .....	25
<b>III. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	27
3.2 Alat dan Bahan.....	27

3.3	Prosedur Penelitian .....	27
3.3.1.	Pengumpulan Sampel.....	27
3.3.2.	Preparasi dan Ekstraksi Sampel .....	28
3.3.3	Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP .....	28
3.3.3.	Analisis Data.....	31
3.3.4.	Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan.....	31
3.3.5.	Ketidakpastian Pengukuran .....	32
<b>IV.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>34</b>
4.2	Penentuan Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Etanol Kulit Kakao dan Kulit Nanas .....	34
4.2.1.	Ekstraksi Sampel.....	34
4.2.2.	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum .....	35
4.2.3.	Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar .....	35
4.2.4.	Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Etanol Kulit Kakao dan Kulit Nanas.....	36
4.3	Validasi Metode.....	40
4.3.1.	Linieritas .....	40
4.3.2.	Akurasi.....	41
4.3.3.	Presisi.....	43
4.3.4.	Penentuan Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantitasi (LoQ).....	44
4.4	Penentuan Ketidakpastian Pengukuran .....	45
4.4.1.	Ketidakpastian dari m sampel.....	46
4.4.2.	Ketidakpastian baku dari Labu Ukur 10 mL.....	47
4.4.3.	Ketidakpastian dari Labu Ukur 100 mL .....	48
4.4.4.	Ketidakpastian dari Labu ukur 250 mL .....	50
4.4.5.	Ketidakpastian dari Mikropipet .....	51
4.4.6.	Ketidakpastian Kemurnian Standar Asam Askorbat .....	52
4.4.7.	Ketidakpastian dari Kurva Kalibrasi.....	53
4.4.8.	Ketidakpastian dari Repeatibilitas .....	54
4.4.9.	Estimasi Ketidakpastian Gabungan Penentuan Aktivitas Antioksidan.....	56
4.4.10.	Ketidakpastian Diperluas .....	58
<b>V.</b>	<b>SIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>61</b>
5.1	Simpulan .....	61
5.2	Saran .....	62
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>63</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>69</b>

1. Perhitungan Kadar Air dan Persen Rendemen .....	70
2. Perhitungan Pembuatan Larutan .....	72
3. Data Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	74
4. Perhitungan Validasi Metode .....	82



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kulit buah kakao .....	10
2. Warna larutan yang tampak dan warna yang terserap pada spektrofotometri UV-Vis .....	15
3. Bagian instrumen spektrofotometer UV-Vis .....	17
4. Kurva variansi Horwitz hubungan konsentrasi dengan KV (%).....	22
5. Diagram alir penelitian.....	33
6. Panjang gelombang maksimum. ....	35
7. Kurva kalibrasi standar asam askorbat.....	36
8. Kurva kalibrasi analisis uji aktivitas antioksidan.....	41
9. Diagram tulang ikan penentuan aktivitas antioksidan .....	46
10. Diagram kontribusi masing-masing ketidakpastian pada sampel kulit kakao .....	59
11. Diagram kontribusi masing-masing ketidakpastian pada sampel kulit nanas .....	60
12. Kurva hubungan absorbansi dengan konsentrasi standar .....	74
13. Kurva hubungan % inhibisi dengan konsentrasi standar .....	75
14. Kurva hubungan absorbansi dengan sampel kulit kakao .....	76
15. Kurva hubungan % inhibisi dengan konsentrasi ekstrak etanol kulit kakao .....	77
16. Kurva hubungan absorbansi dengan konsentrasi standar .....	78
17. Kurva hubungan % inhibisi dengan konsentrasi standar .....	79
18. Kurva hubungan absorbansi dengan ekstrak etanol kulit nanas .....	80
19. Kurva hubungan % inhibisi dengan konsentrasi ekstrak etanol kulit nanas .....	81
20. Kurva standar asam askorbat .....	83

21. Kurva standar asam askorbat .....	84
---------------------------------------	----

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi senyawa kimia pada kulit buah kakao .....	11
2. Kandungan senyawa kimia ekstrak kulit nanas .....	12
3. Hubungan warna pada sinar tampak dengan panjang gelombang .....	16
4. Batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz .....	21
5. Persyaratan presisi dan % <i>recovery</i> .....	23
6. Aktivitas antioksidan pada standar asam askorbat.....	38
7. Aktivitas antioksidan pada sampel kulit kakao .....	38
8. Aktivitas antioksidan pada standar asam askorbat.....	39
9. Aktivitas antioksidan pada sampel kulit nanas .....	39
10. Hasil akurasi untuk ekstrak etanol kulit kakao .....	42
11. Hasil akurasi untuk ekstrak etanol kulit nanas.....	42
12. Pengujian presisi pada sampel kulit kakao .....	43
13. Pengujian presisi pada sampel kulit nanas .....	44
14. Penentuan LoD dan LoQ.....	45
15. Ketidakpastian kurva kalibrasi untuk sampel kakao.....	53
16. Ketidakpastian kurva kalibrasi untuk sampel kulit nanas .....	54
17. Ketidakpastian dari repeatibilitas sampel kulit kakao .....	55
18. Ketidakpastian dari repeatibilitas sampel kulit nanas.....	56
19. Sumber ketidakpastian aktivitas antioksidan .....	57
20. Penentuan larutan sampel dari konsentrasi 1000 ppm dalam labu ukur 10 mL .....	72
21. Penentuan larutan standar dari konsentrasi 100 ppm dalam labu ukur 10 mL .....	73

22. Serapan standar asam askorbat .....	74
23. % Inhibisi dan $IC_{50}$ standar asam askorbat .....	74
24. Penentuan $IC_{50}$ standar asam askorbat .....	75
25. Serapan sampel kulit kakao .....	76
26. % Inhibisi sampel kulit kakao .....	76
27. Penentuan $IC_{50}$ sampel kulit kakao.....	77
28. Serapan standar asam askorbat .....	78
29. % Inhibisi dan $IC_{50}$ standar asam askorbat .....	78
30. Penentuan $IC_{50}$ standar asam askorbat .....	79
31. Serapan ekstrak etanol kulit nanas .....	80
32. % Inhibisi sampel kulit nanas .....	80
33. Penentuan $IC_{50}$ sampel kulit nanas .....	81
34. Penentuan akurasi pada sampel kulit kakao.....	82
35. Penentuan akurasi sampel kulit nanas.....	82
36. Penentuan presisi sampel kulit kakao .....	83
37. Penentuan presisi sampel kulit nanas.....	84
38. Penentuan LoD dan LoQ.....	85
39. Penentuan persamaan regresi linier.....	85



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Komponen antioksidan memiliki peranan penting bagi perlindungan kesehatan tubuh. Para ahli berpendapat bahwa antioksidan mampu mereduksi risiko penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung (Septiana, 2021). Hal ini disebabkan oleh spesies oksigen reaktif yang sangat tidak stabil, dan bereaksi cepat dengan zat lain, termasuk DNA, lipid membran dan protein, sehingga mengakibatkan gangguan kesehatan seperti diabetes melitus, hipertensi, kanker, neurodegeneratif, tukak lambung, dan radang sendi dengan kasus yang meningkat di seluruh dunia (Oboh & Ademosun, 2012). Oleh karena itu, mengkonsumsi produk makanan kaya antioksidan secara positif berhubungan dengan penurunan risiko pengembangan penyakit kronis ini. Disisi lain penggunaan antioksidan sintetik terbatas, karena alasan toksisitas dan karsinogenisitas yang dirasakan. Sehingga pencarian produk makanan nabati yang kaya antioksidan semakin disukai oleh industri makanan sebagai sumber bahan antioksidan alami (Nanasombat *et al.*, 2015).

Suatu jenis tumbuhan dapat memiliki aktivitas antioksidan jika mengandung senyawa seperti fenol, flavonoid, vitamin C dan E, katekin, karoten, dan resveratrol (Saefudin *et al.*, 2013). Buah tergolong sebagai antioksidan alami yang telah terbukti menjadi sumber antioksidan yang baik (Kim *et al.*, 2010). Antioksidan alami yang terdapat pada buah pada kelompok flavonoid berupa senyawa polifenol (Nur, 2011). Antioksidan tersebut akan berperan sebagai *radical scavenger* dan membantu mengubah radikal bebas yang kurang reaktif.

Buah biasanya hanya diolah menjadi buah dalam kemasan atau menjadi bahan makanan lainnya. Hasil samping dari industri pengolahan buah yang dianggap sebagai limbah salah satunya berupa kulit buah yang mewakili hingga 30% dari total berat beberapa buah (Dibanda *et al.*, 2020). Antioksidan yang terdapat pada buah, menarik perhatian karena potensi dan efek terapi yang dimilikinya (Febriyanti, 2018).

Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan salah satu sumber limbah perkebunan di Indonesia. Keberadaan limbah kulit buah kakao sering kali tidak dimanfaatkan dengan baik bahkan dibiarkan begitu saja, sehingga dapat mempengaruhi kebersihan lingkungan (Dibanda *et al.*, 2020). Begitu juga pada kulit buah nanas. Padahal kandungan fenolik dalam beberapa kulit buah dilaporkan lebih banyak daripada bagian buah lainnya (Kim *et al.*, 2010).

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa kulit buah kakao mengandung senyawa polifenol, flavonoid dan tanin yang berfungsi sebagai antioksidan (Palente *et al.*, 2021). Kulit buah kakao adalah sumber yang kaya senyawa flavonoid dan alkaloid, dengan epikatekin dan teobromin sebagai senyawa utamanya dimana senyawa ini dapat bertindak sebagai antioksidan. Kapasitas antioksidan dari kulit buah kakao disebabkan oleh adanya kandungan senyawa fenolik yang tinggi, terutama flavonol (Okiyama *et al.*, 2018). Selain kulit buah tersebut kulit buah lain yang memiliki kandungan antioksidan yang tinggi salah satunya kulit buah nanas. Kulit nanas banyak mengandung flavonoid dan bromelin (Hikal *et al.*, 2021). Aktivitas antioksidan pada kulit buah tersebut dapat diuji dengan berbagai macam metode.

Beragam metode pengukuran telah dikembangkan untuk mengukur karakteristik total antioksidan. Metode pengukuran aktivitas antioksidan tersebut akan mendeteksi karakteristik yang berbeda dari antioksidan dalam sampel, hal ini menjelaskan mengapa metode pengukuran aktivitas yang berbeda akan mengacu pada pengamatan mekanisme kerja antioksidan yang berbeda pula. Salah satu metode yang dapat digunakan yaitu metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Maryam *et al.*, 2016).

Benzie & Strain (1996) mengemukakan bahwa metode FRAP adalah metode yang digunakan untuk menguji antioksidan dalam tumbuh-tumbuhan. Prinsip metode ini dengan menentukan kandungan antioksidan total dari suatu bahan berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  sehingga kekuatan antioksidan suatu senyawa dianalogikan dengan kemampuan mereduksi dari senyawa tersebut (Maryam *et al*, 2016). Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) merupakan metode yang sederhana, cepat, reagen yang digunakan cukup sederhana dan tidak menggunakan alat khusus untuk menghitung total antioksidan (Magfira, 2018).

Metode uji aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao dan kulit buah nanas menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang belum baku sehingga perlu dilakukan suatu validasi metode. Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk peruntukannya (Riyanto, 2017). Dalam hal ini validasi metode dilakukan untuk memastikan bahwa metode uji yang dilakukan akurat dan telah sesuai untuk menguji aktivitas antioksidan pada kulit buah tersebut. Selain itu, validasi metode digunakan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan dalam suatu penelitian memenuhi persyaratan sehingga dapat dinyatakan bahwa data yang diperoleh selama penelitian merupakan hasil yang baik dan dapat dipercaya (Harmita, 2004). Sistem manajemen mutu standar Indonesia 17025 (SNI-17025) tahun 2005 mengharuskan laboratorium pengujian dalam menganalisis bahan menggunakan metode pengukuran yang valid. Parameter yang digunakan dalam validasi metode uji menurut EUROCHEM yaitu presisi, akurasi, batas deteksi (LoD), batas kuantitasi (LoQ), dan linearitas (Riyanto, 2017). Estimasi ketidakpastian pengukuran diperlukan untuk menjamin hasil analisis.

Berdasarkan uraian diatas, maka pada penelitian ini akan dilakukan validasi metode uji aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao dan kulit buah nanas menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis. Serta akan dilakukan pengujian kapasitas antioksidan pada kulit buah. Parameter yang

digunakan untuk memvalidasi metode meliputi presisi, akurasi, linearitas, selektivitas, ketangguhan, batas deteksi dan batas kuantitasi serta estimasi ketidakpastian pengukuran.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Melakukan validasi metode uji aktivitas antioksidan pada menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis dengan parameter presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi dan kuantitasi.
2. Menghitung ketidakpastian pengukuran metode uji aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao dan kulit buah nanas secara Spektrofotometri UV-Vis.
3. Menentukan aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao dan kulit buah nanas menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis.

## **1.3 Manfaat Penelitian**

Adapun manfaat penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode uji aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao dan kulit buah nanas secara Spektrofotometri UV-Vis yang telah divalidasi.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau atom apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Meskipun suatu radikal bebas tidak bermuatan positif atau negatif, spesi semacam ini sangat reaktif karena adanya elektron tidak berpasangan. Suatu radikal bebas biasanya dijumpai sebagai zat antara yang sangat reaktif dan berenergi tinggi (Fessenden & Fessenden, 1992). Untuk memperoleh pasangan elektron, radikal bebas mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron yang berada disekitarnya. Radikal bebas bersifat sangat reaktif, sehingga dapat bereaksi dengan molekul lain seperti karbohidrat, protein, lemak dan DNA. Radikal bebas tidak dapat mempertahankan bentuk asli dalam waktu lama, sehingga harus menyerang molekul stabil terdekat dan mengambil elektron. Zat yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas, sehingga akan memulai reaksi berantai yang akhirnya menyebabkan kerusakan sel (Magfira, 2018).

Sebuah contoh penting dari radikal bebas adalah spesies oksigen reaktif atau *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS dapat bereaksi dengan dan mengganggu makromolekul, seperti protein, lipid, dan asam nukleat dalam tubuh manusia. Jika kerusakan yang disebabkan oleh ROS tidak dapat dihentikan yang menyebabkan stres oksidatif (Schieber & Chandel, 2014). Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh yang dipicu oleh kelebihan radikal bebas dan kekurangan antioksidan. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan oksidatif mulai dari sel, jaringan, hingga organ. Stres oksidatif juga menghasilkan percepatan penuaan (Dibanda *et al.*, 2020).

Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (endogen) dan dari luar tubuh (eksogen). Secara endogen, sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, radikal bebas yang terbentuk dan berpengaruh di dalam sel (intrasel) maupun ekstrasel. Radikal endogen terbentuk sebagai sisa proses metabolisme (proses pembakaran) protein, karbohidrat, dan lemak pada mitokondria dan proses inflamasi atau peradangan. Secara eksogen, sumber radikal bebas berasal dari bermacam-macam sumber diantaranya adalah polutan, radiasi dan pestisida (Sayuti & Yenrina, 2015).

## 2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang mendonorkan elektron kepada radikal bebas yang tidak berpasangan, sehingga mengurangi efek oksidasi radikal bebas (Dibanda *et al.*, 2020). Antioksidan berperan sebagai zat penghambat reaksi oksidasi akibat radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan asam lemak tak jenuh, membran dinding sel, pembuluh darah, basa DNA, dan jaringan lipid sehingga dapat menghambat penyakit penyakit (Wahyuni, 2015).

Menurut Sayuti dan Yenrina (2015), antioksidan berdasarkan fungsi dan mekanisme kerjanya dapat dibagi menjadi 3, yaitu:

1. Antioksidan primer, bekerja untuk mencegah pembentukan senyawa radikal baru, yaitu mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya sebelum senyawa radikal bebas bereaksi. Antioksidan primer mengikuti mekanisme pemutusan rantai reaksi radikal dengan mendonorkan atom hidrogen secara cepat pada suatu lipid yang radikal, produk yang dihasilkan lebih stabil dari produk awal. Antioksidan primer adalah antioksidan yang sifatnya sebagai pemutus reaksi berantai (chain-breaking antioxidant) yang bisa bereaksi dengan radikal-radikal lipid dan mengubahnya menjadi produk-produk yang lebih stabil. Contoh antioksidan primer adalah Superoksida Dismutase (SOD), Glutation Peroksidase (GPx), katalase dan protein pengikat logam.

2. Antioksidan sekunder, bekerja dengan cara mengkelat logam yang bertindak sebagai pro-oksidan, menangkap radikal dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan sekunder berperan sebagai pengikat ion-ion logam, penangkap oksigen, pengurai hidropoksida menjadi senyawa non radikal, penyerap radiasi UV atau deaktivasi singlet oksigen. Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -karoten, isoflavon, bilirubin dan albumin. Potensi antioksidan ini dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya (scavenger free radical) sehingga radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen seluler.
3. Antioksidan tersier Antioksidan tersier bekerja memperbaiki kerusakan biomolekul yang disebabkan radikal bebas, contoh antioksidan tersier adalah enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan metionin sulfida reductase.

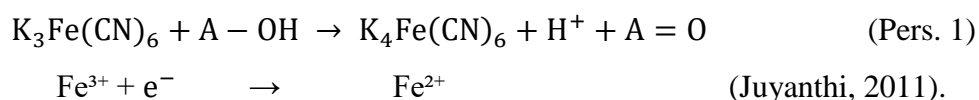
Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibagi menjadi dua yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik dapat diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia, sedangkan antioksidan alami dapat diperoleh dari ekstraksi tumbuhan (Septiana, 2021). Penggunaan antioksidan sintetik terbatas, karena alasan toksisitas dan karsinogenisitas yang dirasakan. Sehingga pencarian produk makanan nabati yang kaya antioksidan semakin disukai oleh industri makanan sebagai sumber bahan antioksidan alami (Nanasombat *et al.*, 2015).

Antioksidan alami umumnya berasal dari tumbuhan yang dapat ditemukan pada bagian kulit kayu, batang, akar, daun, bunga, buah dan kulit buah. Suatu jenis tumbuhan dapat memiliki aktivitas antioksidan jika mengandung senyawa yang mampu menangkal radikal bebas seperti fenol, flavonoid, vitamin C dan E, katekin, karoten, dan resveratrol (Saefudin *et al.*, 2013). Antioksidan alami yang terdapat pada tanaman pada kelompok flavonoid berupa senyawa polifenol (Nur, 2011). Efek antioksidan senyawa fenolik dikarenakan sifat oksidasi yang berperan dalam menetralsasi radikal bebas. Kandungan antioksidan yang terdapat pada tanaman bertindak sebagai radical scavenger dan membantu mengubah radikal bebas yang kurang reaktif. Antioksidan yang terdapat pada tanaman, menarik perhatian karena potensi dan efek terapi yang dimilikinya (Febriyanti, 2018).

Beragam metode pengukuran telah dikembangkan untuk mengukur karakteristik total antioksidan. Metode pengukuran aktivitas antioksidan tersebut akan mendeteksi karakteristik yang berbeda dari antioksidan dalam sampel, hal ini menjelaskan mengapa metode pengukuran aktivitas yang berbeda akan mengacu pada pengamatan mekanisme kerja antioksidan yang berbeda pula. Beberapa metode yang dilakukan yaitu DPPH, CUPRAC, FRAP (Maryam *et al.*, 2016). Banyaknya metode uji aktivitas antioksidan tersebut dapat memberikan hasil uji yang beragam. Hal tersebut diakibatkan oleh adanya pengaruh dari struktur kimiawi antioksidan, sumber radikal bebas, dan sifat fisikokimia sediaan sampel yang berbeda (Maesaroh *et al.*, 2018).

### 2.3 Metode FRAP

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) merupakan metode yang sederhana, cepat, reagen yang digunakan cukup sederhana, dan tidak menggunakan alat khusus untuk menghitung total antioksidan. Menurut Iris F. F. and J. J., (1996) metode FRAP adalah metode yang digunakan untuk menguji antioksidan dalam tumbuh-tumbuhan (Septiana, 2021). Prinsip metode ini adalah adanya reduksi ion ferri menjadi ion ferro oleh senyawa antioksidan (A) dengan reaksi pada pers. 1 sebagai berikut:



Metode FRAP dilakukan berdasarkan kemampuan suatu senyawa dalam mereduksi kalium ferrisianida ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) menjadi kalium ferrosianida ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). Antioksidan dalam sampel akan mereduksi  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  dengan memberikan sebuah elektron. Jumlah kompleks  $\text{Fe}^{2+}$  dapat diketahui dengan mengukur sampel pada panjang gelombang maksimum (Magfira, 2018). Kelebihan metode FRAP ini yaitu metodenya murah, reagensinya mudah disiapkan dan cukup sederhana dan cepat (Maryam *et al.*, 2016). Selain itu, mekanisme kerja metode FRAP seperti didalam tubuh (Yulianti, 2021).



Nilai  $IC_{50}$  merupakan parameter yang banyak digunakan untuk mengukur kekuatan aktivitas antioksidan dari sampel uji. Nilai  $IC_{50}$  dihitung dengan memasukkan persamaan regresi yang diperoleh dari hasil grafik histogram dan hasilnya dalam bentuk  $\mu\text{g/mL}$ . Kapasitas antioksidan adalah pengujian besarnya kemampuan senyawa pada ekstrak bahan alam, yang diekstrak umumnya dengan pelarut metanol dan etanol dalam mereduksi radikal bebas. Kapasitas antioksidan dapat ditentukan dengan menghitung persamaan regresi kurva standar asam askorbat atau vitamin C. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/g ekstrak (AAE) (Salma *et al.*, 2019). Suatu senyawa tergolong sangat kuat bila  $IC_{50}$  nilainya  $<50$  ppm, kuat 50-100 ppm, sedang saat nilainya 101-150 ppm, antioksidan lemah ketika nilainya  $>150$  ppm (Sukweenadhi *et al.*, 2020).

## 2.4 Kulit Buah

Kulit buah merupakan lapisan terluar dari buah yang dapat dikupas. Buah-buahan biasanya diolah dalam kemasan, olahan jus, selai, jeli, acar, dikeringkan, atau dibuat menjadi bahan makanan lainnya. Hasil samping dari industri pengolahan buah yang dianggap sebagai limbah buah adalah inti, biji, *pomace*, dan kulitnya yang mewakili hingga 30% dari total berat beberapa buah (Dibanda *et al.*, 2020). Kandungan fenolik dalam beberapa kulit buah dilaporkan lebih banyak daripada buah yang dikupas dan sebagian besar aktivitas antioksidan total buah dan sayuran terkait dengan kandungan fenoliknya (Kim *et al.*, 2010).

### 2.4.1 Kulit Buah Kakao

Indonesia merupakan negara produsen kakao nomor 3 terbesar diantara 56 negara penghasil buah kakao (Lee *et al.*, 2020). Pada tahun 2019 diperkirakan sekitar 768,77 ribu ton biji kakao dihasilkan dari perkebunan rakyat, 1,62 ribu ton dari perkebunan besar negara dan 3,81 ribu ton berasal dari perkebunan besar swasta (Badan Pusat Statistik, 2020). Tingginya produksi kakao tentu akan berbanding lurus dengan limbah kulit kakao. Kulit kakao memiliki persentase sekitar 67%-76% dari bobot buah kakao segar (Campos-Vega *et al.*, 2018). Produksi buah kakao yang melimpah mengakibatkan menumpuknya limbah kulit buah kakao. Berbagai cara telah dilakukan untuk pemanfaatan kulit buah kakao ini, mulai dari

pembuatan pupuk kompos hingga pakan ternak. Namun, belum ada pemanfaatan yang lebih optimal (Mulyatni *et al.*, 2012). Oleh karena itu, sangat dibutuhkan penanganan lebih lanjut untuk mengoptimalkan pemanfaatan kulit buah kakao ini (Mashuni *et al.*, 2019).

Kulit buah kakao adalah bagian luar buah yang kasar dan berbentuk bulat serta relatif tebal (Sartini *et al.*, 2017). Kulit buah kakao merupakan bagian terluar hingga daging buah sebelum terdapatnya kumpulan biji buah kakao, atau disebut juga bagian dinding buah kakao (mesokarp) (Septiana, 2021). Beberapa penelitian melaporkan bahwa kulit kakao juga mengandung senyawa fitokimia yakni polifenol, flavonoid dan tanin yang berfungsi sebagai antioksidan (Sartini *et al.*, 2017; Vásquez *et al.*, 2019). Kulit buah kakao dapat dilihat pada gambar 1 berikut:



Gambar 1. Kulit Buah Kakao (Fitri, 2021)

Komposisi senyawa kimia pada kulit buah kakao dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Komposisi senyawa kimia pada kulit buah kakao

Senyawa	Massa Kering (g/100 g)
Selulosa	24,24 – 35,0
Hemiselulosa	8,72 – 11,0
Karbohidrat	29,04 – 32,3
Lignin	14,6 – 26,38
Lemak	1,5 – 2,24
Protein	4,21 – 10,74
Abu	6,7 – 10,02
Pektin	6,1 -9,2
Total serat	36,6 – 56,10
Teobromin	0,34
Fenolik	4,6 – 6,9
Tannin	5,2

Sumber: (Vásquez *et al.*, 2019)

Kulit buah kakao adalah sumber yang kaya senyawa flavonol dan alkaloid, dengan epikatekin dan teobromin sebagai senyawa utamanya dimana senyawa ini dapat bertindak sebagai antioksidan. Kapasitas antioksidan dari kulit buah kakao disebabkan oleh adanya kandungan senyawa fenolik yang tinggi, terutama flavonol. Kekuatan antioksidan secara langsung berkaitan dengan komposisi dalam senyawa fenolik, senyawa ini memperkuat karakteristik bioaktif dari kulit buah kakao (Okuyama *et al.*, 2018). Flavonoid bertindak sebagai antioksidan yang kuat sehingga dapat membantu daya tahan tubuh terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh aktivitas radikal bebas (Azizah *et al.*, 2014). Flavonoid juga bermanfaat dalam mengobati kanker, radang, patogen, disfungsi kardiovaskular dan lain-lain (Arifin & Ibrahim, 2018).

Peran flavonoid sebagai antioksidan alami bertindak dengan cara mendonasikan atom hidrogen sehingga dapat mencegah reaksi radikal bebas (Redha, 2010). Flavonoid mampu bekerja dengan cara menangkap radikal bebas melalui

sumbangan atom hidrogen. Kemampuan antioksidan senyawa flavonoid lebih kuat dibandingkan vitamin C dan E (Arifin & Ibrahim, 2018). Kulit buah kakao memiliki kandungan-kandungan senyawa yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Kulit buah kakao berpotensi untuk dijadikan bahan pangan yang dapat memenuhi asupan antioksidan untuk menangkal radikal bebas dalam tubuh manusia (Septiana, 2021).

#### 2.4.4. Kulit Buah Nanas

Kulit buah nanas mengandung vitamin (A dan C), karotenoid, flavonoid, tannin, alkaloid, kalsium, fosfor, magnesium, besi, natrium dan enzim bromelin (Salasa, 2017). Menurut penelitian Yeragamreddy *et al.* (2013) menyatakan bahwa kulit nanas positif mengandung tanin, saponin, steroid, flavonoid, fenol dan senyawa-senyawa lainnya yang disajikan dalam Tabel 2 berikut:

Tabel 2. Kandungan senyawa kimia ekstrak kulit nanas (Yeragamreddy et al., 2013)

Komponen Fitokimia	Hasil
Karbohidrat	+
Tannin	+
Saponin	+
Terpenoid	+
Steroid	+
Flavonoid	+
Alkaloid	+
Fenol	+

Mardalena *et al.* (2011) melaporkan bahwa kulit buah nanas mengandung total antioksidan sebesar 38,95 mg/100 g dengan komponen bioaktif berupa vitamin C sebesar 24,40 mg/100 g, beta karoten sebesar 59,98 ppm, flavonoid 3,47%, kuersetin 1,48%, fenol 32,69 ppm dan saponin 5,29%.

## 2.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain (Septiana, 2021). Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik dan memisahkan senyawa yang mempunyai kelarutan berbeda-beda dalam berbagai pelarut komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan, dan biota laut dengan menggunakan pelarut organik tertentu (Wahyuni, 2015).

Senyawa aktif yang telah diketahui dalam simplisia dapat mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Hal ini disebabkan karena struktur kimia yang berbeda-beda dapat mempengaruhi kelarutan dan stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman (Ditjen POM dan DPOT, 2000). Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sample penyaringan (Azhari, 2018).

Metode ekstraksi menggunakan cara dingin yang umum digunakan diantaranya, meliputi:

### a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar) (Ditjen POM dan DPOT, 2000). Metode maserasi menjadi metode yang paling banyak digunakan karena metodenya yang sederhana. Metode ini dilakukan dengan memasukan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai kedalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Maserasi digunakan pada

sampel yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari (Azhari, 2018).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (exhaustive extraction) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1- 5 kali bahan (Ditjen POM dan DPOT, 2000).

Metode ekstraksi menggunakan cara panas yang umum digunakan diantaranya, meliputi:

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Septiana, 2021).

b. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Ditjen POM dan DPOT, 2000).

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50°C (Ditjen POM dan DPOT, 2000).

d. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (30 menit) dan temperatur sampai titik didih air (Ditjen POM dan DPOT, 2000).

## 2.6 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri merupakan suatu metode analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu larutan berwarna pada

panjang gelombang spesifik, spektrofotometri didasarkan pada absorpsi radiasi elektromagnetik. Prinsip metode Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia (Magfira, 2018).

Pada Spektrofotometri UV-Vis, cahaya yang digunakan memiliki kisaran panjang gelombang (200 – 400) nm untuk sinar ultraviolet dan (400 – 800) nm untuk sinar tampak (visible), serta memiliki energi sebesar 299–149 kJ/mol. Elektron pada keadaan normal atau berada pada kulit atom dengan energi terendah disebut keadaan dasar (*ground-state*). Energi yang dimiliki sinar tampak mampu membuat elektron tereksitasi dari keadaan dasar menuju kulit atom yang memiliki energi lebih tinggi atau menuju keadaan tereksitasi. Cahaya yang diserap oleh suatu zat berbeda dengan cahaya yang ditangkap oleh mata manusia. Cahaya yang tampak atau cahaya yang dilihat dalam kehidupan sehari-hari disebut warna komplementer.



Gambar 2. Warna larutan yang tampak dan warna yang terserap pada Spektrofotometri UV-Vis

Hubungan antara warna pada sinar tampak dengan panjang gelombang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hubungan warna pada sinar tampak dengan panjang gelombang

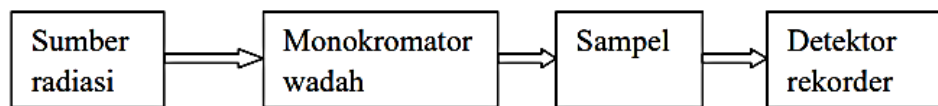
Panjang gelombang	Warna	Warna komplementer
400 nm – 435 nm	Ungu	Hijau kekuningan
435 nm – 480 nm	Biru	Kuning
480 nm – 490 nm	Biru kehijauan	Jingga
490 nm – 500 nm	Hijau kebiruan	Merah
500 nm – 560 nm	Hijau	Ungu kemerahan
560 nm – 580 nm	Hijau kekuningan	Ungu
595 nm – 610 nm	Jingga	Biru kehijauan
610 nm – 680 nm	Merah	Hijau kebiruan
680 nm – 700 nm	Ungu kemerahan	Hijau

Pengukuran panjang gelombang dan absorbansi analit menggunakan alat spektrofotometer melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis. Sehingga Spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan dengan analisis kualitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Day & Underwood, 2002).

Spektrofotometri UV-Vis merupakan suatu metode instrumen dalam analisis kimia yang digunakan untuk mendeteksi senyawa padat maupun cair berdasarkan absorbansi foton. Sampel yang digunakan dalam analisis harus dapat menyerap foton pada daerah UV-Vis (Irawan, 2019). Syarat senyawa dapat dianalisis dengan Spektrofotometri UV-Vis adalah mengandung gugus aoksokrom dan kromofor. Gugus aoksokrom merupakan gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas. Sedangkan gugus kromofor merupakan suatu gugus atau atom dalam senyawa organik sehingga dapat memberikan serapan pada daerah sinar tampak dan ultraviolet (Skoog *et al.*, 2007; Gandjar & Rohman, 2012).

Ada empat bagian utama dari instrumen spektrofotometer, yaitu sumber sinar, monokromator, kuvet dan detector (Skoog *et al.*, 2007). Gambar 4 menunjukkan bagian dari instrumen Spektrofotometer UV-Vis.





Gambar 3. Bagian instrumen Spektrofotometer UV-Vis (Wahyuni, 2015)

#### A. Sumber Radiasi

Sumber radiasi atau lampu pada kenyataannya merupakan dua lampu yang terpisah yang secara bersama-sama mampu menjangkau keseluruhan daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak. Persyaratan sumber yang digunakan dalam spektrofotometri adalah intensitas emisi yang cukup tinggi di wilayah spektral tertentu, stabilitas jangka pendek dan distribusi spasial dari emisi yang seragam (Skoog *et al.*, 2007). Beberapa sumber radiasi yang dipakai pada spektrofotometer adalah lampu deuterium, lampu tungsten, dan lampu merkuri. Disamping itu sebagai sumber radiasi ultra lembayung yang lain adalah lampu xenon (Wahyuni, 2015).

##### 1. Lampu deuterium

Lampu deuterium dapat dipakai pada panjang gelombang 180 nm sampai 370 nm (daerah ultra lembayung dekat).

##### 2. Lampu tungsten

Lampu tungsten merupakan campuran dari filament tungsten gas iodin (halogen), oleh sebab itu sebagai lampu tungsten-iodin pada panjang spektrofotometer sebagai sumber radiasi pada daerah pengukuran sinar tampak dengan rentangan panjang gelombang 380-900 nm (Wahyuni, 2015).

##### 3. Lampu merkuri

Lampu merkuri adalah suatu lampu yang mengandung uap merkuri tekanan rendah dan biasanya dipakai untuk mengecek, mengkalibrasi panjang gelombang pada spektrofotometer pada daerah ultra lembayung khususnya daerah disekitar panjang gelombang 365 nm dan sekaligus mengecek resolusi monokromator (Wahyuni, 2015).

#### 4. Lampu xenon

Penggunaan lampu xenon pada daerah panjang gelombang 200 sampai 1000 nm. Lampu ini pada dasarnya mempunyai kepekaan optimum pada daerah 500 nm (Skoog et al., 2007).

#### B. Monokromator

Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Monokromator terdiri dari filter optik, prisma, kisi difraksi, kuvet, dan detektor.

##### 1. Filter optik

Filter optik berfungsi untuk menyerap warna komplementer sehingga cahaya tampak yang diteruskan merupakan cahaya yang berwarna sesuai dengan warna filter optik yang dipakai. Filter optik yang baik berdasarkan pada interferensi cahaya-cahaya yang saling menguatkan (interferensi konstruktif) dan interferensi cahaya-cahaya yang saling meniadakan (interferensi destruktif) (Mulja & Suharman, 1995).

##### 2. Prisma

Merupakan suatu lempeng kuarsa yang membiaskan sinar yang melaluinya. Banyaknya pembiasan tergantung dengan panjang gelombang sinar, dengan demikian sinar putih dapat terpecah ke dalam warna penyusunnya (Gandjar & Rohman, 2012).

##### 3. Kisi difraksi

Kisi difraksi merupakan kepingan kecil gelas bercermin dan didalamnya terdapat sejumlah garis berarah sama yang terpotong-potong yang digunakan untuk memberikan struktur nampak seperti sisir kecil (Gandjar & Rohman, 2012).

##### 4. Kuvet

Kuvet merupakan wadah dari suatu sampel yang akan dianalisis. Ditinjau dari bahan yang dipakai terdapat dua macam kuvet yaitu kuvet leburan silika dan kuvet dari gelas. Kuvet ini bentuk biasanya terbuat dari quartz atau leburan silika dan ada yang dari gelas dengan bentuk tabung empat persegi panjang 1x1 cm, dengan tinggi kurang lebih 5 cm (Wahyuni, 2015).

## 5. Detektor

Detektor berfungsi untuk mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi suatu sinyal elektronik. Terdapat beberapa macam detector yaitu detektor fotosel, detektor tabung foton hampa, detektor tabung penggandaan foton dan detektor PDA (*Photodiode-Array*) (Mulja & Suharman, 1995).

Prinsip penentuan Spektrofotometri UV-Vis merupakan aplikasi dari Hukum Lambert Bert. Hukum ini menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi kuvet.

Hukum ini secara sederhana dapat dinyatakan dalam rumus pada pers. 2 dan 3 berikut (Skoog et al., 2007):

$$I_0 A = - \log T = \log \frac{I_0}{I_t} \quad (\text{Pers. 2})$$

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Pers. 3})$$

Hukum Lambert – Beer juga berlaku untuk campuran beberapa zat yang menunjukkan tidak adanya suatu interaksi yang ditunjukkan pada persamaan 4 (Skoog et al., 2007):

$$A_{total} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots \quad (\text{Pers. 4})$$

Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dalam suatu tumbuhan. Hasil regresi dari konsentrasi (x) dengan nilai absorbansi (y) larutan pembanding asam askorbat diperoleh persamaan yaitu  $y = bx + a$  dan untuk menghitung nilai aktivitas antioksidan dimasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan tersebut. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg ekuivalen asam askorbat/g ekstrak (AAE).

Kesalahan–kesalahan secara sistematis dalam penggunaan spektrofotometer seringkali terjadi. Penyebab terjadinya kesalahan tersebut meliputi kesalahan serapan oleh larutan yang dapat diatasi dengan penggunaan blanko. Blanko adalah larutan yang berisi matrik selain komponen yang dianalisis, kesalahan serapan oleh kuvet yang dapat diatasi dengan penggunaan jenis, ukuran dan bahan kuvet yang sama untuk tempat blanko dan sampel, dan kesalahan fotometrik normal pada pengukuran absorbansi yang sangat rendah

atau sangat tinggi yang dapat diatasi dengan pengaturan konsentrasi, sesuai dengan kisaran sensitivitas dari alat yang digunakan (Tahir, 2008).

## 2.7 Validasi Metode

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Metode yang dibuat atau yang digunakan harus divalidasi dengan cara dievaluasi dan diuji agar dapat memastikan bahwa metode tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai dengan tujuan (Riyanto, 2017). Beberapa parameter yang digunakan dalam validasi metode meliputi:

### 2.7.1. Presisi

Keseksamaan atau presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita, 2004). Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis suatu sampel. Kemudian ditentukan rata-rata (mean), simpangan baku (SD) dan persen simpangan baku relatif (% RSD) hasil pengukuran (Riyanto, 2017). Nilai simpangan baku (SD) dapat ditentukan melalui persamaan 5 dan 6 berikut:

$$SD = \left[ \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right]^{1/2} \quad (\text{Pers. 5})$$

$$\%RSD = \left[ \frac{SD}{x} \times 100\% \right] \quad (\text{Pers. 6})$$

Dimana  $x_i$  menunjukkan nilai arus puncak larutan,  $\bar{x}$  menunjukkan nilai arus puncak rata-rata,  $n-1$  adalah derajat kebebasan (dengan  $n$  adalah banyaknya pengulangan), RSD adalah simpangan baku relatif, dan  $x$  adalah konsentrasi rata-rata analit (Miller & Miller, 1991).

Penentuan presisi dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan repeatability dan reproducibility. Keterulangan (*repeatability*) adalah keseksamaan metode jika

dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari batch yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal (Harmita, 2004). Ketertiruan (*reproducibility*) adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari batch yang sama.

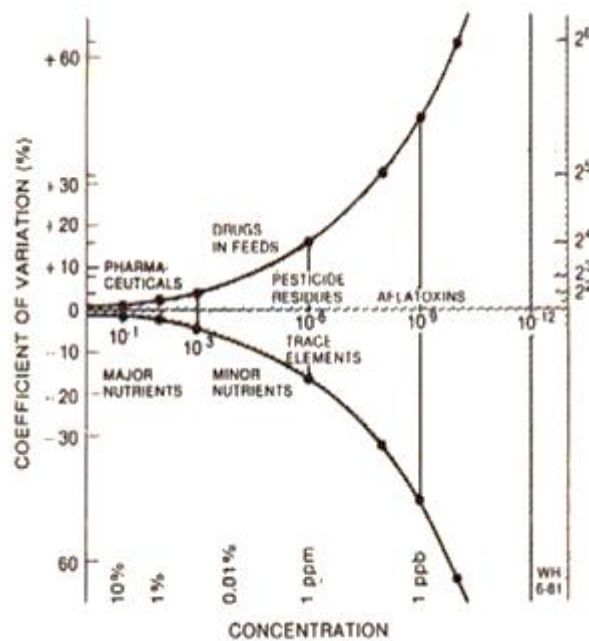
Aturan Horwitz (1995) menyebutkan bahwa metode presisi yang baik ditunjukkan dengan nilai % RSD yang diperoleh dari pengukuran harus lebih kecil dari nilai batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz. % RSD Horwitz dapat dihitung menggunakan Persamaan 7, dimana  $c$  adalah rata-rata konsentrasi (fraksi konsentrasi). Tabel 4 di bawah dapat digunakan sebagai acuan batas keberterimaan presisi.

$$\text{Horwitz \% CV} = (2^{(1-0,5 \log c)}) \quad (\text{Pers. 7})$$

Tabel 4. Batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz

Unit	Batas keberterimaan presisi		
	Repeatability (0,5% $CV_{\text{Horwitz}}$ )	Repro. dalam lab (0,67% $CV_{\text{Horwitz}}$ )	Repro. antar lab (% $CV_{\text{Horwitz}}$ )
100%	1,0	1,3	2,0
10%	1,4	1,9	2,8
1%	2,0	2,7	4,0
0,1%	2,8	3,8	5,7
100 ppm	4,0	5,3	8,0
10 ppm	5,7	7,5	11,3
1 ppm	8,0	10,7	16,0
100 ppb	11,3	15,1	22,6
10 ppb	16,0	21,3	32,0
1 ppb	22,6	30,2	45,3

(Horwitz, 1995).



Gambar 4. Kurva variansi Horwitz hubungan konsentrasi dengan KV (%)

### 2.7.2. Akurasi

Kecermatan atau akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) yang menggunakan CRM (*Certified Reference Material*), dan metode penambahan baku (*standard addition method*).

Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis terlebih dahulu lalu sejumlah larutan standar ditambahkan ke dalam sampel tersebut, kemudian dihomogenkan dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya (AOAC, 2012). Perhitungan % *recovery* dari metode adisi dapat ditetapkan dengan menggunakan Persamaan 8 berikut:

$$\% \text{ Recovery} = \left( \frac{C_{\text{sampel spike}} - C_{\text{sampel blanko}}}{\text{kadar yang ditambahkan}} \right) \times 100\% \quad (\text{Pers. 8})$$

Metode menggunakan CRM dilakukan dengan membandingkan nilai rata-rata hasil pengukuran pengujian dengan nilai sebenarnya dari CRM yang dinyatakan dalam persentase. Perhitungan % *recovery* menggunakan CRM dapat ditetapkan dengan menggunakan Persamaan 9 berikut:

$$\% \text{ Recovery} = \left( \frac{\text{kadar yang diperoleh}}{\text{kadar yang ditambahkan}} \right) \times 100\% \quad (\text{Pers. 9})$$

Apabila CRM tidak tersedia maka dapat menggunakan bahan yang mirip contoh uji yang diperkaya dengan analit yang kemurniannya tinggi atau disebut metode adisi standar, lalu diuji % *recovery*-nya. Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan) (Harmita, 2004).

Persyaratan dari presisi dan *recovery* dapat dilihat pada Tabel 5 berikut:

Tabel 5. Persyaratan presisi dan % *recovery*

Analit %	Rasio analit	Unit	RSD (%)	<i>Recovery</i> (%)
100	1	100%	1,3	98-102
1	10	10%	1,9	98-102
1	10	1%	2,7	97-103
0,1	10	0,1%	3,7	95-105
0,01	10	100 ppm	5,3	90-107
0,001	10	10 ppm	7,3	80-110
0,0001	10	1 ppm	11	80-110
0,00001	10	100 ppb	15	80-110
0,000001	10	10 ppb	21	60-115
0,0000001	10	1 ppb	30	40-120

Sumber: AOAC, 2012

### 2.7.3. Linearitas

Linieritas menunjukkan kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita,

2004). Linearitas secara matematis dinyatakan sebagai persamaan garis linear seperti pada Persamaan 11 berikut:

$$y = a + bx \quad (\text{Pers. 11})$$

dengan a adalah intersep, b adalah slope dan r adalah koefisien korelasi. Nilai a ditentukan dengan persamaan 12 dan b dapat ditentukan dengan persamaan 13 berikut:

$$a = \frac{\sum Yi - b(\sum Xi)}{n} \quad (\text{Pers. 12})$$

$$b = \frac{n(\sum Xi Yi) - (\sum Xi)(\sum Yi)}{n(\sum Xi^2) - (\sum Yi)^2} \quad (\text{Pers. 13})$$

Linearitas dapat ditentukan dari nilai koefisien korelasi (r). Nilai koefisien korelasi dapat ditentukan dengan persamaan 14 berikut:

$$r = \frac{n(\sum Xi Yi) - (\sum Xi)(\sum Yi)}{\sqrt{[(n \sum Xi^2) - (\sum Xi)^2][(n \sum Yi^2) - (\sum Yi)^2]}} \quad (\text{Pers. 14})$$

Nilai (r) yang mendekati satu menggambarkan bahwa konsentrasi larutan standar sebanding dengan respon/intensitas hasil pengukuran. Eurachem (1998) menetapkan kriteria hasil validasi metode analisis pada uji linearitas adalah koefisien determinasi ( $R^2$ )  $\geq 0,990$ . Hal ini menunjukkan bahwa hasil pengukuran tersebut dapat diterima sebagai pembanding/acuan dalam pengukuran sampel.

Linearitas dari suatu metode dapat dievaluasi berdasarkan nilai respon faktornya. Respon faktor tersebut menggambarkan perubahan respon (dalam hal ini intensitas terukur) terhadap perubahan konsentrasi larutan. Selain itu linieritas dapat dilihat dari nilai residualnya, yakni memiliki nilai residual yang terdistribusi secara acak di sekitar garis pusat.

#### 2.7.4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi atau limit of deteksi (LoD) merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi melalui metode yang diterapkan yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko (Riyanto, 2017). Batas deteksi dapat ditentukan dengan penentuan blanko yang diterapkan saat analisis blanko memberikan hasil intensitas tidak sama dengan nol. Batas deteksi



dinyatakan sebagai konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dan batas kuantitasi adalah konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah sepuluh standar deviasi seperti yang ditunjukkan pada persamaan 16 dan 17 berikut:

$$\text{LoD} = x + 3 \text{ SD} \quad (\text{Pers. 16})$$

$$\text{LoQ} = x + 10 \text{ SD} \quad (\text{Pers. 17})$$

dimana x adalah konsentrasi rata-rata blanko.

Batas deteksi juga dapat ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi. Respon instrumen y diasumsikan berhubungan linier dengan konsentrasi x standar untuk rentang konsentrasi yang terbatas. Hal ini dapat dinyatakan dengan persamaan regresi. Model ini digunakan untuk menghitung sensitivitas, batas deteksi, dan batas kuantitasi. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung sesuai Persamaan 18 dan 19 berikut:

$$\text{LoD} = \frac{3 S_{y/x}}{\text{slope}} \quad (\text{Pers. 18})$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 S_{y/x}}{\text{slope}} \quad (\text{Pers. 19})$$

dengan

$$S_{y/x} = \left( \frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2} \right)^{1/2} \quad (\text{Pers. 20})$$

dimana  $S_{y/x}$  adalah simpangan baku fungsi regresi (Miller & Miller, 1991).

## 2.8 Ketidakpastian Pengukuran

Ketidakpastian pengukuran merupakan suatu parameter dalam penetapan rentang nilai yang diperkirakan terhadap kebenaran nilai terukur (Kantasubrata, 2014). Nilai ketidakpastian pengukuran dapat membuat pengguna data hasil uji untuk mengevaluasi keandalan data dan mengevaluasi kesesuaian dengan data hasil uji terhadap tujuan penggunaannya. Perolehan nilai suatu pengukuran kuantitatif hanya sebagai perkiraan terhadap kebenaran nilai dari sifat yang terukur. Nilai ketidakpastian juga menyatakan mutu hasil dalam pengukuran maupun pengujian. Semakin kecil nilai dari ketidakpastian maka semakin baik hasil pengujian tersebut. Parameter ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu tata cara

sampling dan preparasi sampel, kalibrasi peralatan, instrumen, kesalahan random, kesalahan sistemik serta kecakapan personil analisis (Yanlinastuti, 2009).

Kuantitasi komponen ketidakpastian dilakukan dengan cara estimasi agar ekuivalen terhadap simpangan baku dan faktor kesalahannya. Kategori komponen ketidakpastian pada dasarnya dapat dibedakan menjadi dua tipe yaitu tipe A dan tipe B (Birch, 2014). Komponen ketidakpastian tipe A yang termasuk dalam pengujian yaitu kadar presisi pengukuran absorbansi standar dan sampel, presisi penimbangan standar maupun sampel dan linearitas. Sedangkan komponen ketidakpastian tipe B dievaluasi berdasarkan informasi yang dapat dipercaya (data sekunder) misalnya spesifikasi pabrik, data pustaka, dan data validasi metode (Sunardi, 2007).

Evaluasi Tipe A didasarkan pada standar deviasi dari pengukuran ulang, yang untuk  $n$  pengukuran dengan hasil  $q_k$  dan nilai rata-rata  $\bar{q}$ , diperkirakan dengan persamaan 21:

$$s(q_k) = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2} \quad (\text{Pers. 21})$$

Standar kontribusi ketidakpastian  $u_i$  dari pengukuran  $q_k$  tunggal diberikan oleh persamaan 22:

$$u_i = s(q_k) \quad (\text{Pers. 22})$$

Jika pengukuran  $n$  yang rata-rata sama, ini menjadi persamaan 23:

$$u_i = s(\bar{q}) = \frac{s(q_k)}{\sqrt{n}} \quad (\text{Pers. 23})$$

Ketidakpastian baku ( $\mu$ ) untuk tipe A diperoleh melalui persamaan 24:

$$U = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Pers. 24})$$

$$\mu_{\text{linearitas}} = \frac{sd}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{\text{sampel}} - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (\text{Pers. 25})$$

$$\mu_{\text{Gabungan}} = (\mu a/a)^2 + (\mu b/b)^2 + \dots \quad (\text{Pers. 26})$$

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Maret-Desember 2022 di Unit Pelayanan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, bejana maserasi, pipet tetes, mikropipet 100-1000 $\mu$ L, neraca analitik, pH meter, sentrifus, tabung sentrifus, gelas kimia, gelas ukur, botol vial, corong, blender, spatula, batang pengaduk, toples, pisau, kain putih, inkubator, mikropipet, ayakan 70 mesh dan Spektrofotometer UV-Vis.

Bahan-bahan digunakan adalah kulit buah kakao, kulit buah nanas, etanol 70%, etanol PA, NaOH, air bebas CO<sub>2</sub>, kalium ferrisianida, FeCl<sub>3</sub>, TCA, asam askorbat, air suling.

#### **3.3 Prosedur Penelitian**

##### **3.3.1. Pengumpulan Sampel**

Sampel yang digunakan yaitu berupa kulit buah yang telah masak, kulit buah yang diambil meliputi kulit kakao dan kulit buah nanas. Kulit buah kakao didapatkan dari desa Bandarsari, Kec. Padang Ratu, Kab. Lampung Tengah pada tanggal 2 April 2022, sedangkan kulit nanas didapatkan dari penjual buah nanas di sepanjang Jl. ZA Pagar Alam, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung pada tanggal 25 Maret 2022.

### 3.3.2. Preparasi dan Ekstraksi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian kulit buah. Kulit buah disortasi basah, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir. Kemudian dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dibawah sinar matahari sampai kering. Setelah itu, sampel dihancurkan dengan grinder, lalu diayak menggunakan ayakan 70 mesh. Sampel yang diperoleh dari ayakan 70 mesh kemudian dilakukan pengujian kadar air simplisia menggunakan metode oven.

Pengujian kadar air simplisia dilakukan dengan memasukan cawan ke dalam oven selama 15 menit, lalu didinginkan dalam desikator. Setelah itu ditimbang berat cawan kosong. Kemudian simplisia ditimbang sebanyak 2 gram dan dioven selama 3 jam, lalu didinginkan dalam desikator. Setelah dingin cawan yang berisi simplisia ditimbang hingga diperoleh berat konstan. Syarat kadar air dalam simplisia yaitu  $<10\%$ . Sampel lalu disimpan dalam wadah kedap udara sebelum diekstraksi dan dianalisis.

Ekstraksi sampel dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 300 gram simplisia kulit kakao yang telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 1200 mL, kemudian ditutup rapat dan didiamkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 24 jam simplisia dipisahkan antara ampas dan filtratnya. Ampas kembali dimaserasi dengan pelarut yang sama dan diulangi sebanyak 2x replikasi. Ekstrak etanol yang diperoleh dipekatan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

### 3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP

#### A. Penyiapan Reagen Penelitian

Larutan reagen dibuat berdasarkan metode yang telah digunakan oleh Vijayalakshmi (2016).

#### 1. Larutan Dapar Fosfat 0,2 N pH 6,6

Ditimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan dengan akuades bebas CO<sub>2</sub> hingga 250 mL dalam labu ukur. Kemudian ditimbang KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 6,8 gram dan dilarutkan dengan akuades bebas CO<sub>2</sub> hingga 250 mL dalam labu ukur.

Kemudian dipipet sebanyak 16,4 mL NaOH, dimasukkan dalam labu ukur dan dicampurkan 50 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan akuades bebas  $\text{CO}_2$  hingga 200 mL.

2. Larutan Kalium Ferrisianida 1% (b/v)

Ditimbang 1 gram kalium ferrisianida dan dilarutkan dengan air suling, lalu dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah air suling hingga tanda tera.

3. Larutan  $\text{FeCl}_3$  0,1% (b/v)

Ditimbang 0,1 gram  $\text{FeCl}_3$  dan dilarutkan dengan air suling, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL lalu ditambah air suling hingga tanda tera.

4. Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10%

Ditimbang 10 gram TCA dan dilarutkan dengan air suling, dicukupkan hingga 100 mL dalam labu ukur.

B. Penyiapan Larutan Sampel

Pembuatan larutan standar asam askorbat 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dibuat dengan melarutkan 25 mg asam askorbat yang dilarutkan dengan air suling hingga batas labu ukur 25 mL. Selanjutnya dari larutan stok 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diambil masing-masing 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6 mL dan ditempatkan dalam labu ukur 10 mL yang berbeda dan diencerkan dengan air suling hingga 10 mL dan dihomogenkan. Konsentrasi larutan sampel yakni 20; 30; 40; 50; dan 60 ppm.

C. Penyiapan Larutan Standar Asam Askorbat

Pembuatan larutan sampel 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dibuat dengan melarutkan 25 mg asam askorbat yang dilarutkan dengan air suling hingga batas labu ukur 25 mL. Selanjutnya dari larutan stok 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diambil 1 mL, dimasukan dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan air suling sampai tanda tera. Konsentrasi larutan sampel yang didapat adalah 100 ppm. Kemudian masing-masing 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6 mL dan ditempatkan dalam labu ukur 10 mL yang berbeda dan diencerkan dengan air suling hingga 10 mL dan dihomogenkan. Konsentrasi larutan sampel yakni 2; 3; 4; 5; dan 6 ppm.

#### D. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 1 mL larutan asam askorbat 4 ppm, ditambahkan dengan 2,5 mL dapar fosfat pH 6,6 dan 2,5 mL kalium ferrisianida lalu dipipet ke dalam vial kemudian Inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 2,5 mL TCA, larutan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil 2,5 mL lapisan atas kemudian tambahkan 2,5 mL air suling dan 0,6 mL FeCl<sub>3</sub>, diamkan selama 10 menit. Serapan diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum (Magfira, 2018).

#### E. Aktivitas Antioksidan Standar Asam Askorbat

Larutan standar asam askorbat yang telah disiapkan dengan berbagai konsentrasi kemudian diambil masing-masing 1 mL, ditambahkan 2.5 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6.6) dan 2.5 mL K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1% setelah itu, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 2.5 mL TCA lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifus dipipet 2.5 mL lapisan bagian atas kedalam tabung reaksi, dan ditambahkan 2.5 mL akuades dan 0,6 mL FeCl<sub>3</sub> 0,1%. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada pada  $\lambda$  maks. Pengerjaan dilakukan di tempat gelap. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/ gr ekstrak (Yen and Chen, 1995).

#### F. Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP pada Sampel

Larutan sampel yang telah disiapkan dengan berbagai konsentrasi kemudian diambil masing-masing 1 mL, ditambahkan 2,5 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6.6) dan 2,5 mL K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1% setelah itu, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 2,5 mL TCA lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifus dipipet 2,5 mL lapisan bagian atas kedalam tabung reaksi, dan ditambahkan 2,5 mL akuades dan 0,6 mL FeCl<sub>3</sub> 0,1%. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada

pada  $\lambda$  maks. Pengerjaan dilakukan di tempat gelap. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/ gr ekstrak (Yen and Chen, 1995).

### 3.3.3. Analisis Data

Persamaan regresi linier menggunakan microsoft excel digunakan untuk menghitung absorbansi dan mengetahui persamaan garis antara absorbansi dengan konsentrasi standar asam askorbat. Rumus persamaan regresi linier adalah sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

dengan  $y$  = absorbansi atau garis regresi,  $a$  = slope,  $b$  = intersep, dan  $x$  = variable bebas.

Rumus penentuan aktivitas antioksidan menurut Magfira (2018):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi blanko}}{\text{Absorbansi sampel}} \times 100\%$$

Pada penentuan *Inhibitory Concentration* ( $IC_{50}$ ) nilai  $IC_{50}$  dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal FRAP dari masing-masing konsentrasi larutan sampel berdasarkan rumus diatas. Dari nilai % Inhibisi pada berbagai konsentrasi, selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel sebagai sumbu  $x$  dan % inhibisi sebagai sumbu  $y$ . Nilai  $IC_{50}$  didapat dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% dari persamaan  $y = a + bx$ .

### 3.3.4. Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan

Validasi metode yang diuji menggunakan lima parameter yaitu akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantitas, dan linearitas.

#### A. Penentuan Linieritas

Penentuan linearitas dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi larutan standar dengan variasi konsentrasi 2 ppm, 3 ppm, 4 pm, 5 ppm, dan 6 ppm. Nilai absorbansi yang diperoleh dibuat persamaan linier hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi. Nilai  $R$  diperoleh menunjukkan linieritas (Gandjar dan

Rohman, 2007). Nilai koefisien relasi ( $R^2$ ) memenuhi syarat linieritas jika nilai  $R^2$  mendekati 1.

#### B. Penentuan Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan cara menambahkan larutan standar ke dalam suatu sampel. Standar asam askorbat 4 ppm ditambahkan ke dalam sampel kulit buah kakao dan kulit buah nanas dengan konsentrasi masing-masing 20; 40; dan 60 ppm. Kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 3 replikasi dan ditentukan % *recovery* (Wahyuni, 2015). Parameter ini dikatakan akurat bila % *recovery* yang didapatkan yaitu 97-103%.

#### C. Penentuan Presisi

Penentuan presisi dilakukan dengan cara melakukan uji menggunakan metode FRAP dengan konsentrasi masing-masing sampel 20; 40; 50 atau 60 ppm dan diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 697 nm. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Kemudian ditentukan nilai %RSD. Parameter ini dikatakan telah memenuhi syarat apabila telah sesuai dengan batas keberterimaan presisi menurut persamaan Horwitz pada Tabel 4.

#### D. Penentuan Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantisasi (LoQ)

Penentuan LoD dan LoQ untuk sampel dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi dalam konsentrasi standar (Riyanto, 2017). Kurva kalibrasi tersebut dibuat dalam konsentrasi 2 ppm; 3 ppm; 4 ppm; 5 ppm; dan 6 ppm.

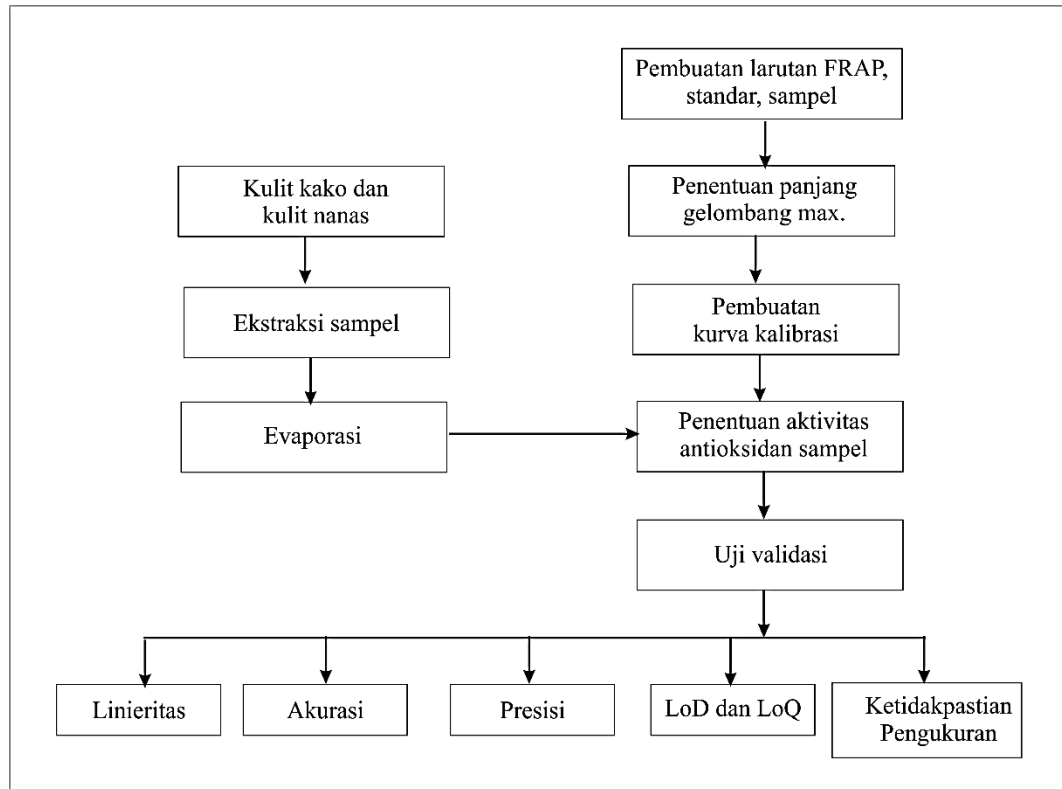
#### 3.3.5. Ketidakpastian Pengukuran

Estimasi nilai ketidakpastian dapat dihitung setelah diperoleh data hasil pengukuran dalam validasi metode uji aktivitas antioksidan kulit buah kakao dan kulit buah nanas menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis. Data tersebut kemudian dilanjutkan dengan perhitungan ketidakpastian pengukuran dari masing-masing faktor yang dapat mempengaruhi pengujian



aktivitas antioksidan. Penentuan estimasi ketidakpastian pengukuran berdasarkan Riyanto (2017).

Bagan alir dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5 berikut:



Gambar 5. Diagram alir penelitian

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel kulit kakao dan sampel kulit nanas menunjukkan bahwa kedua sampel memiliki aktivitas antioksidan yang sangat besar karena memiliki nilai  $IC_{50} < 50$  ppm.
2. Nilai  $IC_{50}$  beserta estimasi ketidakpastian dari uji aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis sampel kulit buah kakao dan kulit buah nanas masing-masing yaitu  $33,076 \pm 1,4480$  dan  $39,066 \pm 1,6702$ .
3. Parameter linearitas, akurasi, dan presisi pada metode uji aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis menunjukkan hasil yang baik dan telah memenuhi syarat keberterimaan pada setiap metodenya, sehingga metode tersebut dapat digunakan untuk pengujian rutin di laboratorium.
4. Batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ) untuk uji aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP secara Spektrofotometri UV-Vis berturut-turut adalah  $0,7567$  ppm dan  $2,5225$  ppm.

## 5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Larutan FRAP bersifat kurang stabil sehingga harus dibuat secara *in time* dan harus segera digunakan.
2. Validasi metode yang telah dilakukan hanya meliputi 5 parameter, perlu dilakukan validasi metode lanjutan dengan parameter spesifitas (*specificity*), ketangguhan (*robustness*), kekasaran (*ruggedness*), kesesuaian sistem (*system suitability*) dan linearitas dan selektivitas.
3. Metode analisis uji aktivitas antioksidan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis perlu dilakukan verifikasi dahulu sebelum digunakan dalam pengujian di Laboratorium yang bertujuan meningkatkan nilai keabsahan dari metode analisis.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 2012. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F*. 1-17.
- Azhari, A. B. M. 2018. *Efektivitas Ekstrak Bawang Dayak (Eleutherine Palmifolia (L)) Terhadap Pertumbuhan Stafilokokus Aureus Isolat Pus Infeksi Odontogenik*. (Skripsi). Universitas Sumatera Utara.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1): 21–29.
- 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.
- Badan Pusat Statistik. 2020. *Statistik Kakao Indonesia (Indonesian Cocoa Statistic)*. Badan Pusat Statistik. Jakarta.
- Benzie, I.F., & Strain, J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": the FRAP Assay. *Analytical Biochememistry*. 239(1).
- Birch, K. 2014. Measurement Good Practice Guide No. 36 Estimating Uncertainties in Testing An Intermediate Guide to Estimating and Reporting Uncertainty of Measurement in Testing. *British Measurement and Testing Association*. Addison-Wesley Publishing Company, Inc, London.
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. 2018. Cocoa

(Theobroma cacao L.) Pod Husk: Renewable Source of Bioactive Compounds. *Trends in Food Sci Technol.* 81: 172–184.

- Day, R A, & Underwood, A L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Erlangga, Jakarta.
- Dibanda, R. D., Panyoo, A. E., Rani P., A., Metsatedem, T. Q., & Mbofung, F. C. M. 2020. Effect of microwave blanching on antioxidant activity, phenolic compounds and browning behaviour of some fruit peelings. *Food Chem*, 302.
- Ditjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Cetakan Pertama*. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Febriyanti, F., Suharti, N., Lucida, H., Husni, E., & Sedona, O. 2018. Karakterisasi dan Studi Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Secang (*Caesalpinia sappan L.*). *J. Sains Farm. Klin.* 5(1): 23-27.
- Fessenden, Ralph J. & Fessenden, Joan. S. 1992. *Kimia Organik*. Erlangga, Jakarta.
- Fitri, E. 2021. *Pemanfaatan Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.) Sebagai Produk Minuman Antioksidan Penghambat Aktivitas Radikal Bebas Dalam Tubuh Manusia*. (Skripsi) . Universitas Negeri Padang. Padang.
- Gandjar, I., & Rohman, A. 2012. *Analisis Obat Secara Spektroskopi dan kromatografi*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Harmita, H. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 1(3): 117–135.
- Hikal, W. M., Mahmoud, A. A., Said-Al Ahl, H. A. H., Bratovic, A., Tkachenko, K. G., Kačániová, M., & Rodriguez, R. M. 2021. Pineapple (*Ananas comosus L. Merr.*), Waste Streams, Characterisation and Valorisation: An Overview. *Journal of Ecology.* 11(09): 610–634.
- Horwitz, W. 1995. Protocols for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies. *Pure Appl. Chem.* 67: 331-343.

- ICH. 2005. *ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.
- Irawan, A. 2019. Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran dalam Kegiatan Penelitian dan Pengujian. *Indonesian Journal of Laboratory*. 1(2): 1.
- Iris F. F., B., & J. J., S. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Academic Press*.
- Jayanthi. P. & Lalitha, P. 2011. Reducing Power of The Solvent Extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 3.(3): 126-128
- Kim, H., Moon, J. Y., Kim, H., Lee, D. S., Cho, M., Choi, H. K., Kim, Y. S., Mosaddik, A., & Cho, S. K. 2010. Antioxidant and antiproliferative Activities of Mango (*Mangifera indica L.*) Flesh and Peel. *Food Chem*. 121(2): 429–436.
- Lee, C. L., Kuo, H. W., Chang, C. C., & Cheng, W. 2020. Injection of an Extract of Fresh Cacao Pod Husks Into *Litopenaeus Vannamei* Upregulates Immune Responses Via Innate Immune Signaling Pathways. *Fish Shellfish Immunol*. 104: 545–556.
- Maesaroh, K., Kurnia, D., & Al Anshori, J. 2018. Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC Terhadap Asam Askorbat, Asam Galat dan Kuersetin. *Chimica et Natura Acta*. 6(2): 93.
- Magfira. 2018. *Analisis Penghambatan Ekstrak Etanol Batang Kembang Bulan (Tithonia ediversifolia) Terhadap Reaksi Oksidasi dari Radikal Bebas Dengan Metode DPPH ABTS dan FRAP*. (Skripsi). Universitas Hasanuddin. Makasar.
- Mardalena, Warli, L., Nurdin, E., Rusmana, W.S.N. & Farizal. 2011. *Milk Quality of Dairy Goat By Giving Feed Supplement as Antioxidant Source*. *Faculty of Animal Husbandry*. Andalas University, Padang.

- Maryam, S., Baits, M., & Nadia, A. 2016. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera Lam.*) Menggunakan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). *J. Fitofarmaka Indones.* 2(2): 115–118.
- Mashuni, M., Kadidae, L. O., Jahiding, M., Dermawan, M. A., & Hamid, F. H. 2019. Pemanfaatan Kulit Buah Kakao sebagai Antibakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *BioWallacea.* 6(2): 1017.
- Miller, J., & J.C. , M. 1991. *Statistika untuk Kimia Analitik*. ITB, Bandung
- Mulja, M, Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Nanasombat, S., Thonglong, J., & Jitlakha, J. 2015. Formulation and characterization of novel functional beverages with antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities. *J. Func. Foods Health Dis.* 5(1): 1–16.
- Nur, A. M. 2011. *Kapasitas Antioksidan Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia) dalam Bentuk Segar, Simplisia dan Keripik, pada Pelarut Nonpolar, Semipolar dan Polar*. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 1–109.
- Oboh, G., & Ademosun, A. O. 2012. Characterization of the Antioxidant Properties of Phenolic Extracts From Some Citrus Peels. *J. Food Sci. Tech.* 49(6): 729–736.
- Okiyama, D. C. G., Soares, I. D., Cuevas, M. S., Crevelin, E. J., Moraes, L. A. B., Melo, M. P., Oliveira, A. L., & Rodrigues, C. E. C. 2018. Pressurized Liquid Extraction of Flavanols and Alkaloids from Cocoa Bean Shell Using Ethanol as Solvent. *J. Int. Food Res.* 114: 20–29.
- Palente, I., Suryanto, E., & Momuat, L. I. 2021. Karakterisasi Serat Pangan Dan Aktivitas Antioksidan Dari Tepung Kulit Kakao (*Theobroma cacao L.*). *Prog Chem.* 14(1): 70–80.
- Riyanto. 2017. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji*. Deepublish, Yogyakarta.
- Redha, A. 2010. Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam

- Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196–202.
- Saefudin, Marusin, S., & Chairul. 2013. Antioxidan Activity on Six Species of Sterculiaceae Plants. *J. Penelit. Has.Hutan*. 31(2): 103–109.
- Salasa, A. M. 2017. *Aktivitas Ekstrak Kulit Buah Nanas (Ananas comosus L.) Terhadap Pertumbuhan Pseudomonas aeruginosa*. XIII(2): 210093.
- Salma, H., Sedjati, S. S., & Ridlo, A. 2019. Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Metanol *Sargassum sp.* *J. Mar.Res.* 8(1): 41–46.
- Sartini, S., Asri, R. M., & Ismail, I. 2017. Pengaruh Pra Perlakuan Sebelum Pengeringan Sinar Matahari Dari Kulit Buah Kakao Terhadap Kadar Komponen Fenolik Dalam Ekstrak. *Bioma*. 2(1): 15–20.
- Sayuti, K., dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan Alami Dan Sintetik*. Andalas University Press, Padang.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24(10): 453–462.
- Septiana, B. 2021. *Karakteristik Simplisa dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (Eleutherine bulbosa (L.) Merr.) dengan Metode FRAP Secara Spektrofotometri Sinar Tampak*. (Skripsi).
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. 2007. *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Thomson Corporation, Canada.
- Sukweenadhi, J., Yunita, O., Setiawan, F., Kartini, Siagian, Ma. T., & Danduru, Anggreyni Pratiwi Avanti, C. 2020. Antioxidant Activity Screening of Seven Indonesian Herbal Extract. *Biodiversitas*. 21(5): 2062–2067.
- Sunardi, Susana, T.S., & Elin, N. 2007. Ketidakpastian Pengukuran Pada Metode AANC Untuk Analisis N, P, K, Si, Al, Cu, Fe dalam Cuplikan Sedimen. *Prosiding PPI-PDIPTN*. Pustek Akselerator dan Proses Bahan BATAN. ISSN 0216-3128.



- Tahir, M. Indariani & M. Sitanggang. 2008. *Sansevieria Eksklusif*. PT Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Vásquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Góes Neto, A., & Soccol, C. R. 2019. Biotechnological Approaches for Cocoa. *Waste Manage.* 90: 72–83.
- Vijayalakshmi, M. & Ruckmani, K. 2016. Ferric Reducing Anti-oxidant Power Assay in Plant Extract. *J. Pharmacol. Ther.* 11: 570-752.
- Wahyuni, I. R. 2015. *Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak-NHeksan, Etil Asetat, Etanol 70% Umbi Talas Ungu Metode DPPH, CUPRAC Secara Spektrofotometri UV-Vis*. Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar, Makassar.
- Yanlinastuti, S., Fatimah, Chaidir, A., & Indrayanti, S. 2007. Estimasi Ketidakpastian Pengukuran Pada Penentuan Thorium dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis. *Prosiding Seminar Pengelolaan Perangkat Nuklir*. PTBN-BATAN.
- Yen, G. C. & Hui, Y. C. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32.
- Yeragamreddy, P. R., Peraman, R., Chilamakuru, N. B., & Routhu, H. 2013. In Vitro Antitubercular and Antibacterial Activities Of Isolated Constituents and Column Fractions from Leaves of *Cassia Occidentalis*, *Camellia Sinensis* and *Ananas Comosus*. *J. Pharmacol. Ther.* 2(4): 116–123.
- Yulianti, R. A. 2021. *Antioxidant Activity Test Of Cotton Banana Peel Extract (Musa Paradisiaca L.) Using The Frap Method And Dpph In Hand And Body Lotion*. *Media Informasi.* 17(2): 86-92.