PAULUS CHEM ENGINEERING JOURNAL

Volume 2 Nomor 1, Februari 2024,
ISSN 3026-2666

Pemisahan dan Identifikasi Komponen Bioaktif Alkaloid dan Flavonoid pada Biji Kakao dari Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah Melalui Studi Spektrofotometri UV dan KLT

The Separation and Identification of Bioactive Alkaloid and Flavonoid Components in Cocoa Beans from South Sulawesi and Central Sulawesi Through UV Spectrophotometry and TLC Studies

Sepriyana Marisa[1], Neitania Gabriella.T.Sule[1], Lyse Bulo[1], Rosalia Sira Sarungallo[1], Lydia Melawaty[1]
Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Kristen Indonesia Paulus Makassar[1]
* Email: lyse@ukipaulus.ac.id

Abstrak

Biji kakao mengandung beberapa senyawa yang bermanfaat bagi kesehatan antara lain: polifenol, flavonoid, alkaloid, mineral, dan protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan mengkarakterisasi kandungan alkaloid dan flavonoid pada biji kakao dari Sulawesi Selatan (Tondon) dan Sulawesi Tengah (Morowali). Isolasi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pengadukan. Identifikasi dilakukan dengan uji warna dan spektrofotometri UV. Karakterisasi isolat alkaloid dan flavonoid dilakukan dengan berbagai pereaksi warna dan uji KLT menggunakan berbagai pengelusi. Hasil isolasi biji kakao memberikan larutan berwarna merah tua untuk alkaloid dan merah untuk flavonoid. Identifikasi dengan pereaksi pewarna Lugol untuk alkaloid menghasilkan larutan berwarna coklat, sementara untuk flavonoid menghasilkan larutan berwarna ungu dengan pereaksi $FeCl_3$. Hal ini menunjukkan bahwa isolat biji kakao dari Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah mengandung alkaloid dan flavonoid. Pengujian spektrofotometri UV menunjukkan panjang gelombang maksimum untuk isolat alkaloid biji kakao Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah, berturut-turut: 280 nm, abs 1,009; 277 nm, abs 0,0695. Untuk isolat flavonoid biji kakao Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah, berturut-turut: 274 nm, abs 1,251; 274 nm, abs 1,152. Uji KLT dengan fase diam silika gel GF_{254} memberikan pemisahan terbaik dalam sistem pelarut etil asetat-metanol (4:1), menghasilkan bercak berwarna coklat dengan pereaksi pewarna Lugol dengan nilai Rf 0,727 dan 0,745 untuk alkaloid biji kakao dari Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah. Sistem pelarut kloroform-metanol (9:1) menghasilkan bercak berwarna ungu dengan pereaksi pewarna $FeCl_3$ dengan nilai Rf 0,200 dan 0,181 untuk alkaloid biji kakao dari Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah.

Kata Kunci : *Alkaloid, Bji Kakao, Flavonoid, Isolat, SulSel, SulTen, Spektrofotometri UV, Uji KLT.*

Abstract

Cocoa beans contain several beneficial compounds for health, including polyphenols, flavonoids, alkaloids, minerals, and proteins. This research aims to isolate, identify, and characterize the alkaloid and flavonoid contents of cocoa beans from South Sulawesi (Tondon) and Central Sulawesi (Morowali). Isolation was carried out using the maceration method with stirring. Identification was conducted using color tests and UV spectrophotometry. Characterization of alkaloid and flavonoid isolates was performed using various color reagents and TLC tests with various eluents. The isolation of cocoa beans yielded dark red solutions for alkaloids and red solutions for flavonoids. Identification with Lugol's color reagent for alkaloids resulted in a brown solution, while for flavonoids, a purple solution was obtained with $FeCl_3$ color reagent. This indicates that cocoa bean isolates from South Sulawesi and Central Sulawesi contain alkaloids and flavonoids. UV spectrophotometry testing showed maximum wavelength for alkaloid isolates from cocoa beans from South Sulawesi and Central Sulawesi, respectively: 280 nm, abs 1.009; 277 nm, abs 0.0695. For flavonoid isolates from cocoa beans from South Sulawesi and Central Sulawesi, respectively: 274 nm, abs 1.251; 274 nm, abs 1.152. TLC testing with silica gel GF_{254} stationary phase provided the best separation in the ethyl acetate-methanol solvent system (4:1), producing brown spots with Lugol's color reagent with Rf values of 0.727 and 0.745 for alkaloids from cocoa beans from South Sulawesi and Central Sulawesi. The chloroform-methanol solvent system (9:1) produced purple spots with FeCl3 color reagent with Rf values of 0.200 and 0.181 for alkaloids from cocoa beans from South Sulawesi and Central Sulawesi, respectively.

Keywords: *Alkaloids, Cocoa beans, Flavonoids, South Sulawesi, Central Sulawesi, UV spectrophotometry, TLC Test*

Pendahuluan

Kakao merupakan salah satu komoditas ekspor yang memberikan kontribusi terhadap pendapatan devisa Indonesia. Kakao menempati peringkat ketiga dalam sektor ekspor perkebunan yang berkontribusi pada devisa negara. Iklim dan kontur tanah di Indonesia (terutama di Sulawesi dan Sumatra) sangat cocok untuk pertumbuhan tanaman kakao (Suryani, 2007).

Jenis kakao yang dominan diusahakan adalah kakao lindak, dengan pusat produksi utama di Sulawesi

Selatan, Sulawesi Tenggara, dan Sulawesi Tengah (Kom. Persaingan Usaha, 2005). Ekspor biji kakao Sulawesi Tengah mencatatkan angka tertinggi pada tahun 2009 (dibandingkan minyak mentah, Sulawesi Tengah), mencapai sekitar US$ 228.313.000, dengan produksi yang terus meningkat setiap tahunnya menjadi sekitar 195.846 ton pada tahun 2013, di mana 7,3% berasal dari Morowali. Tidak jauh berbeda, ekspor biji kakao Sulawesi Selatan mencapai US$ 149.895.000 dengan produksi sekitar 195.846 ton pada tahun 2013, di mana Toraja Utara menyumbang sebesar 25% dengan luas lahan sekitar 2.582 hektar (Sumber: Badan Koordinasi Penanaman Modal (BKPM) 2015).

Manfaat kakao untuk makanan dan minuman, dan juga bermanfaat dalam industri kosmetik, farmasi, dan kimia. Sejak tahun 1990-an, penelitian tentang kakao semakin banyak mengarah pada makanan fungsional. Makanan fungsional adalah makanan atau komponen diet yang memberikan manfaat kesehatan berdasarkan kandungan nutrisinya (Albrecht, dkk., 2010). Kakao dimanfaatkan sebagai "makanan fungsional" karena mengandung beberapa senyawa yang bermanfaat bagi kesehatan, termasuk polifenol, flavonoid, alkaloid, mineral, dan protein.

Biji kakao mengandung alkaloid seperti teobromin, feniletilamin, dan anandamida. Teobromin adalah komponen alkaloid dominan yang terdapat dalam biji kakao, dengan kandungan sekitar 1-4% (Lim, 2012), dengan rasa pahit, sedikit larut dalam air, berbentuk kristal, dan berwarna putih hingga tidak berwarna. Bispo (2002) melaporkan bahwa teobromin memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti anti kanker, diuretik, stimulan jantung, hipokolesterolemik, relaksan otot polos, vasodilator asma, dan vasodilator koroner.

Selain teobromin, biji kakao juga mengandung katekin, senyawa flavonoid dominan yang mengandung sekitar 33-42% (Misnawi, 2003). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa tersebut adalah pigmen merah, ungu, dan biru, dan sebagian adalah pigmen kuning yang ditemukan dalam tumbuhan. Flavonoid memiliki kerangka karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dengan dua cincin benzene (C6) yang terikat pada suatu rantai propana (C3), membentuk susunan C6-C3-C6. Osakabe (2001) dan Yamagishi (2000) menyatakan bahwa flavonoid dapat mencegah pembentukan radikal bebas, melindungi oksidasi LDL darah, bersifat antimutagenik, dan menghambat pertumbuhan tumor.

Komponen fungsional dalam biji kakao, baik organik maupun anorganik, dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk varietas, kondisi tanaman, iklim, wilayah pertumbuhan, kematangan buah, praktik budidaya, dan metode pengolahan (Hayati, dkk., 2011; Indah, 2012; Meng, dkk., 2009; dan Smit, 2011).

Pemisahan dan identifikasi senyawa bioaktif dalam biji kakao dapat dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Spektrofotometri UV. Metode KLT adalah teknik kromatografi yang digunakan untuk memisahkan campuran senyawa kimia berdasarkan karakteristik polaritas, yang melibatkan penggunaan fase diam berupa lapisan tipis silika gel atau alumina yang diaplikasikan pada lempeng kaca, plastik, atau aluminium foil. Keunggulan dari metode KLT yaitu dapat menganalisis banyak sampel sekaligus dengan biaya yang rendah, serta kemudahannya dalam visualisasi hasil. Senyawa yang terpisah dapat diidentifikasi melalui penggunaan pereaksi penampak yang menghasilkan warna bila berinteraksi dengan senyawa tertentu. Seperti yang dijelaskan oleh Goswami-Giri dan Ingawale (2021), KLT menggunakan prinsip adsorpsi, dengan media umum seperti silika gel dan oksida alumina, yang menunjukkan efektivitasnya dalam memisahkan komponen berdasarkan polaritas pada berbagai aplikasi analitis. Metode ini juga diaplikasikan dalam penelitian oleh Namir dkk. (2019), yang menggunakan KLT untuk analisis kualitatif bahan peledak. Sementara Spektrofotometri UV adalah teknik analisis yang mengukur berdasarkan absorpsi cahaya UV yang diserap oleh sampel. Setiap senyawa memiliki profil serapan cahaya, yang dapat digunakan untuk identifikasi dan kuantifikasi. Teknik ini dijelaskan oleh Passos dan Saraiva (2019) sebagai metode sederhana, yang memanfaatkan penyerapan cahaya pada panjang gelombang UV-Vis untuk kuantifikasi sampel dalam jumlah sangat kecil. Borghi dkk., (2020) juga menunjukkan penerapan spektrofotometri UV dalam kuantifikasi dan klasifikasi minyak sayur dalam sampel minyak zaitun ekstra virgin, menggunakan teknik ini dalam menganalisis komponen yang kaya akan asam lemak tak jenuh.

Penelitian ini bertujuan untuk memisahkan dan mengidentifikasi alkaloid dan flavonoid dalam biji kakao yang berasal dari Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah, dengan menggunakan metode KLT dan spektrofotometri UV.

Metode Penelitian

Bahan baku utama yang digunakan adalah biji kakao kering yang diperoleh dari daerah Tondon, Tana Toraja (Sulawesi Selatan) dan Morowali (Sulawesi Tengah). Bahan pendukung meliputi N-heksan, Metanol, Kloroform, Aseton, Etil Asetat, Etanol, Asam sulfat, Lugol, HCl 0.1 N, NaOH 0.1 N, dan H_2SO_4.

Peralatan yang digunakan meliputi Rotavapor, pelat KLT, Erlenmeyer, labu ukur, pipet kapiler, tabung reaksi, gelas piala, dan pipet volumetri.

Tahap Penelitian

Tahap awal penelitian dimulai dengan menentukan kadar air biji kakao. 10 gram serbuk biji buah kakao dan dimasukkan ke dalam wadah yang sebelumnya telah dikeringkan di dalam oven dan ditimbang beratnya. Kemudian, serbuk kakao dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama dua jam. Setelah proses pengeringan selesai, berat contoh biji kakao ditimbang kembali. Selanjutnya,

kadar air dihitung dengan mengurangi berat contoh setelah pengeringan dengan berat contoh awal, kemudian hasilnya dikalikan 100%. Proses pengukuran kadar air biji kakao dilakukan beberapa kali hingga diperoleh hasil yang stabil dan konsisten.

Proses isolasi, identifikasi, dan karakterisasi senyawa-senyawa dalam biji kakao **(Astuti dkk, 2000; Harlim, T dkk, 2009)**

1. Penghilangan Lemak

Satu kilogram biji kakao diekstraksi menggunakan pelarut n-heksan. Tujuannya adalah untuk menghilangkan komponen lemak dari biji kakao.

2. Ekstraksi Pertama (Ekstraksi I)

a. Residu biji kakao yang telah bebas dari lemak kemudian diekstraksi kembali menggunakan pelarut metanol. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam residu dalam metanol selama 24 jam, dan proses ini diulang sebanyak tiga kali untuk memaksimalkan ekstraksi senyawa-senyawa yang diinginkan.
b. Ekstrak metanol yang dihasilkan kemudian disaring untuk memisahkan partikel-partikel tidak larut dan dievaporasi menggunakan suhu 40°C dalam kondisi vakum hingga terbebas dari metanol.

3. Pembentukan Garam-Garam Alkaloid

Ekstrak metanol yang telah dihasilkan kemudian diasamkan dengan menggunakan larutan HCl 0,1 N hingga pH larutan mencapai 2. Proses ini bertujuan untuk menghasilkan garam-garam alkaloid dari senyawa-senyawa yang terdapat dalam biji kakao.

4. Ekstraksi Kedua (Ekstraksi II)

Filtrat dari proses sebelumnya kemudian diekstraksi dengan menggunakan pelarut kloroform hingga fase organik tidak lagi memiliki warna. Selanjutnya, fase air dibasakan dengan menambahkan larutan NaOH 0,1 N hingga pH mencapai 10. Tujuan dari langkah ini adalah untuk memisahkan senyawa-senyawa organik dari senyawa-senyawa anorganik dalam biji kakao.

5. Ekstraksi Ketiga (Ekstraksi III)

Larutan yang telah dibasakan tersebut kemudian diekstraksi kembali menggunakan pelarut kloroform. Fase organik yang diduga mengandung alkaloid dievaporasi pada suhu 40°C dalam kondisi vakum hingga diperoleh isolat yang pekat. Sementara itu, fase air yang diduga mengandung flavonoid juga dievaporasi pada suhu 40°C hingga diperoleh isolat yang pekat.

6. Ekstraksi Keempat (Ekstraksi IV)

Proses ekstraksi dengan kloroform dilakukan kembali pada larutan yang telah dibasakan. Fase organik yang mengandung alkaloid kemudian dievaporasi pada suhu 40°C dalam kondisi vakum hingga diperoleh isolat yang pekat. Fase air yang mengandung flavonoid juga dievaporasi pada suhu 40°C hingga diperoleh isolat yang pekat.

Analisis

a. Pengujian dengan Peraksi Alkaloid dan Flavonoid

- Sejumlah 1 ml isolat yang diduga mengandung alkaloid dimasukanke dalam tabung reaksi lalu ditetesi dengan pereaksi Lugol lalu diamati perubahan warnanya jika berubah menjadi coklat maka larutan tersebut positif mengandung alkaloid.
- Sejumlah 1 ml isolate yang digunakan mengandung flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditetesi dnegan pereaksi $FeCl_3$ lalu diamatiperubahan warnanya jika berubah menjadi ungu maka larutan tersebut positif mengandung Flavonoid(Harbone,1987).

b. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Isolat diteteskan pada pelat kromatografi lapis tipis, pelat kemudian dielusi dengan beberapa sistem pelarut untuk mendapatkan sistem pelarut dengan pemisahan yang terbaik. Pewarnaan dilakukan dengan pereaksi Lugol dan H_2SO_4 untuk alkaloid dan $FeCl_3$ untuk flavonoid.

Sistem pelarut yang akan dicoba pada isolat alkaloid adalah : (Cordell,1981)

- Kloroform metanol (9:1)
- Kloroform-etil-asetat-metanol (2:2:1)
- Etil asetat-metanol (4:1)
- Kloroform-aseton (5:4)

Sistem pelarut yang akan dicoba pada isolat flavonoid adalah:

- Kloroform : metanol (9:1),
- aseton : *n*-heksana (5:5), dan
- *n*-heksana : etil asetat (8:2).

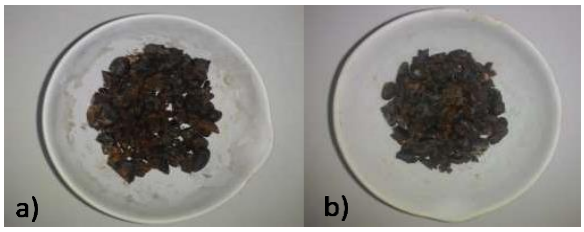
c. Pengujian Spektrofotometri UV

Sejumlah 5 ml isolat alkaloid dan flavonoid masing-masing dilarutkan dalam 100 ml metanol dengan menggunakan labu takar. Larutan ini kemudian diukur serapan ultravioletnya dengan pembanding metanol.

Hasil

Kadar Air

Biji kakao kering yang berasal dari Tondon, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tengah telah menjalani proses pengupasan kulit, dan kemudian dibobot sebanyak 10 gram untuk setiap sampel.



Gambar 1. a) Biji kakao SulTen, b) Biji kakao SulSel

Analisis kadar air, diperoleh hasil biji kakao dari Sulawesi Selatan (SulSel) memiliki kadar air yang rendah, yakni sebesar 1,04%, sementara biji kakao dari Sulawesi Tengah (SulTen) memiliki kadar air sedikit lebih tinggi, yakni sebesar 1,34% (Rubiyo, dkk., 2020). Hasil analisis mengindikasikan bahwa kadar air biji kakao dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan proses pasca-panen yang berbeda antara dua lokasi tersebut. Streule, dkk., (2022) melaporkan bahwa kelembapan yang meningkat selama proses proses pasca-panen dapat meningkatkan kadar air biji kakao, sehingga perlu pengontrolan kondisi lingkungan selama pengeringan dan penyimpanan.

Proses Isolasi

Sebanyak 1 kg biji kakao kering masing-masing berasal dari Sulawesi Selatan (SulSel) dan Sulawesi Tengah (SulTen) diekstraksi terlebih dahulu dengan n-heksan untuk menghilangkan lemak dari biji kakao. Residu yang tersisa kemudian diekstraksi dengan metanol. Ekstrak metanol yang berwarna kemerahan dipekatkan melalui evaporasi pada suhu 40°C di bawah kondisi vakum, untuk meminimalkan kerusakan pada alkaloid dan flavonoid.

Ekstrak konsentrat selanjutnya diatur pH-nya menjadi 2 menggunakan HCl 0,1 N, untuk pembentukan garam alkaloid dan pemisahan asam organik, menyebabkan warna larutan berubah menjadi lebih muda. Garam alkaloid yang terbentuk dan larut dalam air dipisahkan dari senyawa yang larut dalam fase organik dengan cara ekstraksi menggunakan kloroform, yang diulang sampai fase organik tidak berwarna lagi. Fase air mengandung garam alkaloid dengan warna merah tua, sedangkan fase organik berisi flavonoid.

Untuk membebaskan alkaloid dari bentuk garamnya, larutan fase air di-basa dengan penambahan NaOH 0,1 N hingga pH mencapai 10, dimana pada kondisi ini, hampir semua alkaloid terlepas. Larutan yang telah dibasa ini berwarna merah kehitaman dan kemudian diekstraksi dengan kloroform, untuk melarutkan alkaloid bebas. Fase organik, yang diharapkan mengandung alkaloid, kemudian dievaporasi pada suhu 40°C.

Indentifikasi alkaloid dalam fase organik diverifikasi dengan uji Lugol, yang menunjukkan bahwa tidak ada alkaloid yang terlarut. Sebaliknya, alkaloid ditemukan dalam fase air yang berwarna merah kehitaman, mengindikasikan bahwa sifat basa dari biji kakao cukup lemah dan ekstraksi alkaloid dengan penggunaan asam yang lebih kuat dan pekat.

Pengujian dengan Pereaksi Alkaloid dan Flavonoid

Verifikasi komposisi kimia dari isolat yang diduga mengandung alkaloid dan flavonoid, dilakukan pengujian menggunakan reagen, yang bertujuan untuk identifikasi senyawa kimia dari masing-masing senyawa yang terkandung dalam isolat. Pada pengujian alkaloid, isolat diuji dengan menambahkan Lugol. Hasil yang diperoleh adalah larutan berwarna coklat kemerah-merahan, yang mengindikasikan kemungkinan keberadaan alkaloid dalam sampel. Metode ini sering digunakan dalam skrining fitokimia, seperti yang dilaporkan oleh Medina-Zazueta dkk. (2023), yang menggunakan Lugol dalam pengujian fitokimia untuk mengidentifikasi alkaloid dalam ekstrak daun. Sementara itu, pengujian flavonoid dilakukan dengan menambahkan $FeCl_3$ (*ferric chloride*) ke dalam sampel. Reaksi antara $FeCl_3$ dan flavonoid menghasilkan senyawa kompleks berwarna yang dapat diinterpretasikan sebagai indikator positif adanya flavonoid. Dalam penelitian ini, larutan menunjukkan warna ungu, yang menandakan adanya flavonoid dalam isolat. Sarjono dkk. (2019) juga menggunakan $FeCl_3$ dalam pengujian mereka untuk menunjukkan keberadaan flavonoid dalam ekstrak biologis, memberikan bukti visual senyawa flavonoid.

Pengujian Kromatografi Lapis Tipis

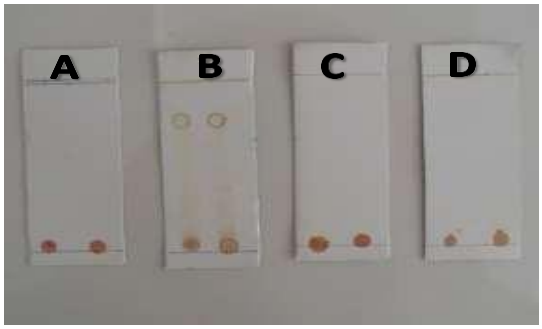
a. Alkaloid

Pengujian kromatografi lapis tipis dilaksanakan pada isolat dari masing-masing sampel biji kakao. Dalam pengujian ini, digunakan dua jenis reagen penampak, yaitu Lugol dan H_2SO_4, untuk menampakkan senyawa alkaloid pada pelat kromatografi. Prosesnya melibatkan dua tetes sampel larutan alkaloid pada setiap pelat, yang kemudian dielusi menggunakan empat jenis sistem pelarut yang berbeda. Setelah proses elusi, pelat ditetesi dengan reagen penampak. Hasil dari pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Daftar Nilai Rf Ekstrak Alkaloid dengan Pereaksi Lugol

Pelarut	Biji Kakao SulSel		Biji Kakao SulTen	
	Rf	Warna Noda	Rf	Warna Noda
Kloroform-etilasetat-metanol (2:2:1)	-	-	-	-
Etil asetat-metanol (4:1)	0,727	Coklat	0,745	Coklat
Kloroform-metanol (9:1)	-	-	-	-
Kloroform-Aseton (5:4)	-	-	-	-

Dari empat sistem pelarut yang diuji, pelarut etil asetat-metanol (4:1) berhasil menghasilkan satu noda berwarna coklat pada pelat kromatografi. Hasil yang diperoleh mengindikasikan bahwa isolat yang dianalisis mengandung alkaloid. Selain itu, pewarnaan menggunakan pereaksi H_2SO_4 menghasilkan kromatogram yang menampilkan banyak noda ketika menggunakan sistem pelarut kloroform-etil asetat-metanol (2:2:1). Sementara itu, untuk sistem pelarut etil asetat-metanol (4:1), hanya terbentuk satu noda.



Gambar 4.2 Pelat KLT dengan pereaksi penampak Lugol

Noda ini memiliki nilai Rf yang relatif konsisten dengan nilai Rf noda yang dihasilkan oleh pereaksi Lugol, yaitu sebesar 0,727 untuk ekstrak alkaloid dari Sulawesi Selatan (SulSel) dan 0,745 untuk ekstrak alkaloid dari Sulawesi Tengah (SulTen).

Tabel 4.2 Daftar Nilai Rf Ekstrak Alkaloid dengan Pereaksi H_2SO_4, Biji Kakao Sulawesi Selatan

Pelarut	Biji Kakao Sulawesi Selatan								
	Rf								Warna Noda
A	0,054	0,127	0,182	0,236	0,309	0,364	0,455	0,473	Coklat
B	0,727	-	-	-	-	-	-	-	Coklat
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan :
A = Kloroform-etilasetat-metanol (2:2:1)
B = Etil asetat-metanol (4:1)
C = Kloroform-metanol (9:1)
D = Kloroform-Aseton (5:4)

Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak yang diperoleh hanya mengandung satu jenis alkaloid. Hal ini didasarkan pada pengamatan bahwa, meskipun banyak noda terdeteksi dengan pereaksi H_2SO_4, hanya satu noda yang bereaksi positif dengan pereaksi Lugol. Noda lain yang muncul pada kromatogram dengan pereaksi H_2SO_4 diduga merupakan senyawa non-alkaloid yang masih terkandung dalam ekstrak alkaloid tersebut. Nilai Rf dari noda yang bereaksi dengan uap iodium dapat dilihat pada Tabel 4.2.

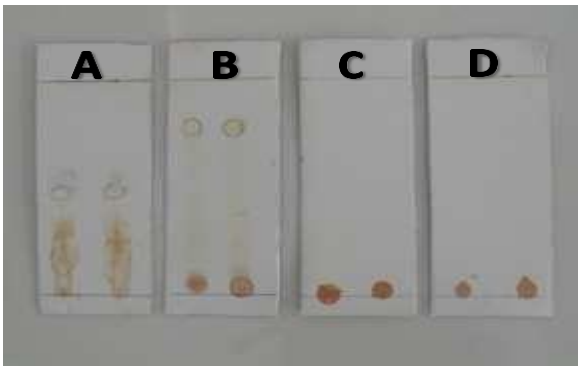
Tabel 4.3 menampilkan hasil kromatografi lapis tipis menggunakan empat sistem pelarut berbeda (A, B, C, dan D) untuk analisis alkaloid dalam biji kakao dari Sulawesi Tengah dengan menggunakan H_2SO_4 sebagai pereaksi penampak. Pelarut A (Kloroform-etil asetat-metanol 2:2:1), menunjukkan banyak noda dengan nilai Rf yang bervariasi dari 0,054 hingga 0,455, menandakan keberagaman senyawa yang dilarutkan oleh sistem pelarut ini. Warna noda coklat menunjukkan bahwa senyawa tersebut bereaksi dengan H_2SO_4, mengindikasikan gugus fungsional tertentu yang berinteraksi dengan asam.

Pada sistem Pelarut B (Etil asetat-metanol 4:1), hanya satu noda yang muncul dengan nilai Rf 0,745, sesuai dengan data sebelumnya yang menunjukkan bahwa sistem pelarut ini dapat menarik keluar satu jenis alkaloid. Pelarut C (Kloroform-metanol 9:1) dan D (Kloroform-Aseton 5:4), tidak menunjukkan adanya noda, yang dapat mengindikasikan bahwa sistem pelarut ini tidak efektif dalam mengelusi alkaloid yang terdapat dalam sampel atau senyawa yang larut dalam sistem ini tidak bereaksi dengan H_2SO_4.

Tabel 4.3 Daftar Nilai Rf Ekstrak Alkaloid dengan Pereaksi H_2SO_4

Pelarut	Biji Kakao Sulawesi Tengah								
	Rf								Warna Noda
A	0,054	0,109	0,164	0,218	0,290	0,345	0,400	0,455	Coklat
B	0,745	-	-	-	-	-	-	-	Coklat
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan :
A = Kloroform-etilasetat-metanol (2:2:1)
B = Etil asetat-metanol (4:1)
C = Kloroform-metanol (9:1)
D = Kloroform-Aseton (5:4)



Gambar 4.3 Pelat KLT dengan pereaksi penampak H_2SO_4

Gambar 4.3 merepresentasikan secara visual data yang ditampilkan pada Tabel 4.3, dimana pelat yang digunakan dengan sistem pelarut A menunjukkan keberagaman noda. Keterlihatan noda dalam pelbagai rentang Rf mengkonfirmasi analisis kuantitatif yang diberikan dalam tabel.

b. Flavonoid

Isolat dari masing-masing biji kakao yang diduga mengandung flavonoid diuji menggunakan teknik Kromatografi Lapis Tipis. Dalam pengujian ini, setiap pelat kromatografi ditetesi dengan sampel dan larutan flavonoid pembanding (pirogalol). Kemudian, pelat tersebut dielusi menggunakan tiga jenis sistem pelarut yang berbeda, sebelum akhirnya ditetesi dengan pereaksi penampak $FeCl_3$. Hasil dari pengujian dapat dilihat pada tabel yang disajikan di bawah.

Pada Tabel 4.4 menyajikan data Rf dan warna noda untuk ekstrak flavonoid dari biji kakao Sulawesi Selatan menggunakan tiga sistem pelarut yang berbeda (A, B, dan C), serta larutan pirogalol sebagai pembanding.

Pelarut untuk isolat flavonoid biji kakao menggunakan pelarut A (Aseton-n-heksan 5:5), menunjukkan dua nilai Rf (0,218 dan 0,290) dengan warna noda ungu, yang menunjukkan reaksi positif flavonoid dengan $FeCl_3$. Pelarut B (Kloroform-metanol 9:1) memberikan nilai Rf yang sedikit lebih tinggi (0,200 dan 0,273) dengan warna noda serupa, mengindikasikan keberadaan flavonoid yang konsisten.

Tabel 4.4 Daftar Nilai Rf Ekstrak Flavonoid dengan Pereaksi $FeCl_3$

Pelarut	Biji Kakao Sulawesi Selatan		
	Rf		Warna noda
A	0,218	0,290	Ungu
B	0,200	0,273	Ungu
C	0,036	-	Ungu

Pelarut	Larutan Pirogalol						
	Rf						Warna Noda
A	0,500	0,590	0,681	-	-	-	Ungu
B	0,227	0,300	0,336	0,381	0,427	0,490	Ungu
C	0,036	-	-	-	-	-	Ungu

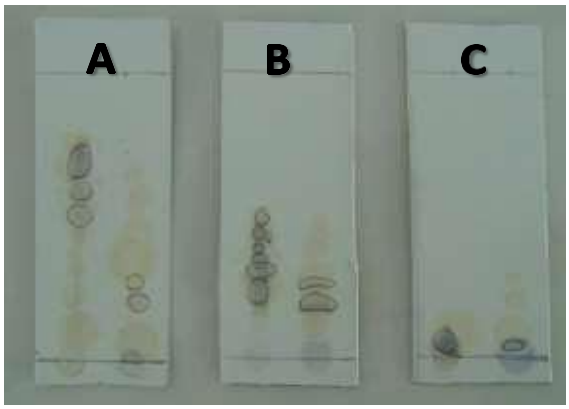
Keterangan :

A = Aseton-n-heksan (5:5)

B = Kloroform-metanol (9:1)

C = N-heksan-etil asetat (8:2)

Untuk pelarut C (N-heksan-etil asetat 8:2), hanya satu nilai Rf (0,036) yang terdeteksi dengan warna noda ungu. Pelarut untuk larutan pirogalol menggunakan pelarut A menunjukkan tiga nilai Rf (0,500, 0,590, 0,681) tanpa noda pada nilai tertinggi, namun dua noda dengan warna ungu pada nilai Rf yang lebih rendah. Pada pelarut B, diperoleh hasil yang lebih bervariasi dengan nilai Rf (0,227, 0,300, 0,336, 0,381, 0,427, 0,490) semua menunjukkan noda ungu.



Gambar 4.4 Pelat KLT dengan Isolat Flanonoid SulSel

Sementara pelarut C tidak menghasilkan noda, menunjukkan bahwa pelarut ini kurang efektif dalam mengelusi flavonoid dari pirogalol.

Gambar 4.4 menampilkan pelat kromatografi yang digunakan dalam pengujian, dengan visualisasi noda pada masing-masing pelarut yang digunakan, untuk memberikan verifikasi visual dari data yang dicatat dalam tabel. Dari gambar terlihat distribusi dan intensitas noda yang sesuai dengan nilai Rf yang tercatat.

Tabel 4.5 Daftar Nilai Rf Ekstrak Flavonoid dengan Pereaksi $FeCl_3$

Pelarut	Biji Kakao SulTen		
	Rf		Warna Noda
A	0,181	0,236	Ungu
B	0,181	-	Ungu
C	-	-	Ungu

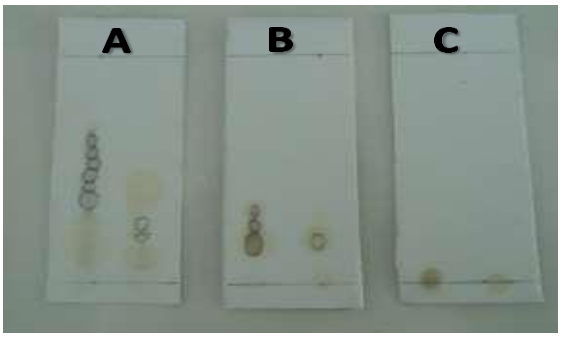
Pelarut	Larutan Pirogalol						
	Rf						Warna Noda
A	0,345	0,400	0,454	0,490	0,545	0,600	Ungu
B	0,136	0,218	0,399	-	-	-	Ungu
C	-	-	-	-	-	-	Ungu

Keterangan :

A = Aseton-n-heksan (5:5)

B = Kloroform-metanol (9:1)

C = N-heksan-etil asetat (8:2)



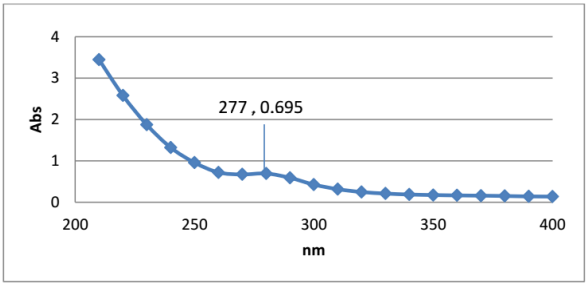
Gambar 4.5 Pelat KLT dengan Isolat Flanonoid SulTen

Begitu halnya dengan isolat flavonoid biji kakao SulTen, noda pemisahan yang cukup baik tampak pada eluen kloroform-metanol (9:1) (lihat Gambar 4.5). Demikian juga halnya dengan Rf dengan pereaksi $FeCl_3$ yang hampir sama dengan Rf yang dihasilkan larutan Pirogalol yaitu berturut-turut sebesar 0,181 dan 0,136 (Tabel 4.5).

Pengujian Spektrofotometri UV

A. Alkaloid

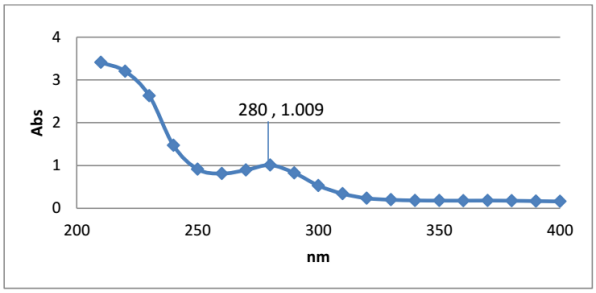
Grafik Spektrum UV isolat alkaloid biji kakao SulTeng, menunjukkan puncak absorpsi pada panjang gelombang 277 nm dengan absorbansi sebesar 0.695. Puncak ini menunjukkan karakteristik absorpsi UV dari alkaloid dalam sampel.



Gambar 4.6 Grafik Spektrum UV isolat alkaloid biji kakao SulTen.

Spektrum menunjukkan penurunan absorbansi yang stabil dari 200 nm hingga 277 nm, diikuti oleh penurunan yang lebih landai setelah puncak hingga 400 nm. Hal ini mengindikasikan adanya komponen dengan struktur kimia yang stabil dalam menyerap UV pada rentang ini.

Pada Grafik Spektrum UV isolat alkaloid biji kakao SulSel, puncak absorpsi terlihat pada 280 nm dengan nilai absorbansi 1.009, lebih tinggi dibandingkan dengan SulTen. Hal ini menunjukkan konsentrasi alkaloid yang lebih tinggi atau perbedaan dalam komposisi kimia alkaloid.



Gambar 4.7 Grafik Spektrum UV isolat alkaloid biji kakao SulSel.

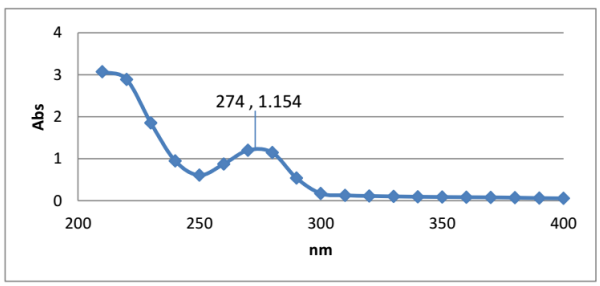
Spektrum pada Gambar 4.7 juga menunjukkan penurunan yang stabil mulai dari 200 nm hingga titik puncak dan kemudian menurun lebih landai setelah 280 nm, serupa dengan spektrum dari SulTen, tetapi dengan absorbansi yang secara keseluruhan lebih tinggi.

Perbedaan puncak absorpsi antara dua sampel (277 nm dan 280 nm) disebabkan oleh variasi dalam struktur molekular alkaloid yang terkandung dalam biji kakao dari dua lokasi yang berbeda. Menurut de Rezende Mudenuti dkk. (2018), variasi dalam struktur fenolik dan alkaloid dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan serta profil absorpsi UV pada berbagai produk kakao.

Nilai absorbansi yang lebih tinggi pada spektrum SulSel menunjukkan bahwa isolat dari lokasi ini mungkin mengandung konsentrasi alkaloid yang lebih tinggi atau bahwa alkaloidnya memiliki afinitas yang lebih kuat terhadap UV pada panjang gelombang tertentu. Penelitian oleh Bucheli, G Rousseau, M Alvarez (2001) melaporkaN bahwa variasi kandungan metabolit sekunder selama pematangan biji kakao dapat mempengaruhi absorbansi UV. Sementara Astuti, Y., dkk. (2010) melaporkan spektrum ultraviolet yang didapat dari isolat alkaloid mempunyai panjang gelombang maksimum pada rentang 225.0-337,5 nm.

A. Flavonoid

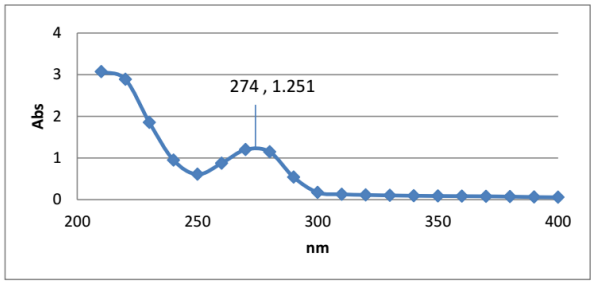
Berdasarkan Gambar 4.8 grafik spektrum UV isolat flavonoid biji kakao SulTen. Grafik menampilkan puncak absorpsi pada panjang gelombang 274 nm dengan nilai absorbansi 1.154. Hal ini menunjukkan bahwa flavonoid dalam sampel memiliki kecenderungan untuk menyerap cahaya UV pada panjang gelombang ini.



Gambar 4.8 Grafik Spektrum UV isolat flavonoid biji kakao SulTen.

Terjadi penurunan absorbansi dari 200 nm menuju 274 nm, menunjukkan peningkatan penyerapan hingga mencapai puncak. Setelah puncak, absorbansi menurun secara stabil, mengindikasikan kestabilan struktur flavonoid terhadap rentang UV yang lebih lebar. Barbosa-Pereira dkk. (2021) melaporkan variasi dalam puncak absorbansi yang mirip pada spektrum UV untuk sampel dari berbagai wilayah, mengkaji peran struktural flavonoid dalam interaksi spektra UV.

Pada Gambar 4.9 grafik spektrum UV isolat flavonoid biji kakao SulSel, sama seperti SulTen, grafik untuk SulSel juga menunjukkan puncak pada 274 nm, tetapi dengan absorbansi yang sedikit lebih tinggi, yaitu 1.251. Hal ini menunjukkan konsentrasi flavonoid yang lebih tinggi atau varian flavonoid dengan sifat absorptif yang lebih kuat dalam sampel SulSel. Profil spektrumnya mirip dengan SulTen, dengan penurunan sebelum puncak dan penurunan yang lebih landai. Hal ini menunjukkan bahwa kedua sampel memiliki kualitas yang serupa dalam hal komposisi flavonoid.



Gambar 4.9 Grafik Spektrum UV isolat flavonoid biji kakao SulSel.

Perbedaan kecil dalam nilai absorbansi antara dua sampel mungkin mengindikasikan perbedaan dalam konsentrasi flavonoid atau varian flavonoid yang sedikit berbeda antara kedua lokasi, yang bisa dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti kondisi tanah, iklim, dan teknik pertanian.

Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, terbukti bahwa biji kakao asal Sulawesi Tengah (SulTen) dan Sulawesi Selatan (SulSel) mengandung alkaloid dan flavonoid. Penggunaan sistem kromatografi lapis tipis dengan ekstraksi cair-cair, menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak etil asetat-metanol (4:1), menghasilkan noda berwarna coklat. Pereaksi Lugol yang digunakan dalam pengujian menunjukkan nilai Rf sebesar 0,727 untuk ekstrak biji kakao SulSel dan 0,745 untuk ekstrak biji kakao SulTen. Noda coklat ini menunjukkan reaksi positif terhadap keberadaan alkaloid.

Pengujian kromatografi lapis tipis untuk isolat flavonoid, pemisahan terjadi pada fase gerak kloroform-metanol (9:1). Penggunaan pereaksi penampak $FeCl_3$ menghasilkan noda berwarna ungu dengan nilai Rf sebesar 0,200 untuk ekstrak biji kakao SulSel dan 0,181 untuk ekstrak biji kakao SulTen. Noda ungu ini menunjukkan hasil yang positif untuk flavonoid.

Pengujian spektrum UV, isolat alkaloid dari biji kakao Sulawesi Selatan menunjukkan puncak absorbansi pada panjang gelombang 280 nm dengan nilai absorbansi sebesar 1,009, yang menandakan keberadaan konsentrasi alkaloid. Sementara itu, isolat dari Sulawesi Tengah menunjukkan puncak pada panjang gelombang yang sedikit lebih pendek, yaitu 277 nm, dengan absorbansi yang lebih rendah, sebesar 0,695, yang mengindikasikan adanya perbedaan dalam komposisi atau konsentrasi alkaloid di antara kedua sampel.

Selanjutnya, dalam pengujian isolat flavonoid, kedua sampel menunjukkan puncak absorbansi pada panjang gelombang yang sama, 274 nm, namun dengan nilai absorbansi yang berbeda. Ekstrak biji kakao dari Sulawesi Selatan memiliki absorbansi yang lebih tinggi, yaitu 1,251, dibandingkan dengan ekstrak dari Sulawesi Tengah yang memiliki absorbansi sebesar 1,154. Hal ini menunjukkan bahwa kedua sampel mengandung flavonoid, tetapi dengan konsentrasi yang berbeda.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam proses penelitian ini, dan kami berharap hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat yang baik bagi semua pihak.

Daftar Pustaka

Albrecht, JA; CJ Schwarz; M Schnepf. 2010. *Chocolate-A Functional Food.*Nebraska Extension.

Assa, Asma. 2015. Proposal Penelitian Citarasa Biji Kakao (Theobroma cacao L.) dalam Dinamika Komponen Katekin dan Teobromin Selama Prosese Fermentasi. Program Pascasarjana, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Makassar.

Astuti, Y., Nur, M A., Adijuwana, H. 2010. Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi Alkaloid dari Kulit Kayu Johar (Cassia siamea Lamk.). http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/26027.

Badan Koordinasi Penanaman Modal, 2015. http://www.bkpm.go.id/ diunduh 16 November 2015.

Barbosa-Pereira, L., Belviso, S., Ferrocino, I., Rojo-Poveda, O., & Zeppa, G. (2021). Characterization and Classification of Cocoa Bean Shells from Different Regions of Venezuela Using HPLC-PDA-MS/MS and Spectrophotometric Techniques Coupled to

Chemometric Analysis. Foods, 10(8), 1791. doi:10.3390/foods10081791.

Borghi, F. T., Santos, P. C., Santos, F. D., H. C. Nascimento, M., Corrêa, T., Cesconetto, M., … Filgueiras, P. R. (2020). Quantification and classification of vegetable oils in extra virgin olive oil samples using a portable near-infrared spectrometer associated with chemometrics. Microchemical Journal, 105544. doi:10.1016/j.microc.2020.105544.

Bucheli, P., Rousseau, G., Alvarez, M., Laloi, M., & McCarthy, J. (2001). Developmental Variation of Sugars, Carboxylic Acids, Purine Alkaloids, Fatty Acids, and Endoproteinase Activity during Maturation ofTheobroma cacaoL. Seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(10), 5046–5051. doi:10.1021/jf010620z.

Goswami Giri, A S., Ingawale, D S. 2021. Chromatography: a Versatile Technique for Separation. Recent Advancements in Analytical Chemistry, Editor: N Padmaja dan Vishnu Kiran Manam, Sciengpublications, hal. 76-87.

Indah, G, 2012, Theobroma cacao, www.scrib.com/doc/1008157178/Theobroma cacao diakses 10-07-2015.

Hayati, R; Yusmanizar dan H. Fauzi, 2011. Pengaruh Lama Fermentasi dan Suhu pada Mutu Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Jurnal Ekonomi dan Pembangunan Bappeda Aceh ISSN 0852-9124. 2(1) Juli 2011.

Khopkar, S. 2002. Konsep Dasar Kimia Analitik. UI-Press. Jakarta.

Komisi Pengawas Persaingan Usaha. 2009. Bacground Paper Kajian Industri dan Perdagangan Kakao data dari Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian, 2005. pp.2.

Medina-Zazueta, L., Miranda-Castro, F. C., Romo-Garcia, F., Martínez-Gil, M., Esparza-Ponce, H. E., Encinas-Basurto, D., Ibarra, J. 2023. Development of Sustainable Magnetic Biosorbent Using Aqueous Leaf Extract of Vallesia glabra for Methylene Blue Removal from Wastewater. Sustainability, 15(5), 4586; https://doi.org/10.3390/ su15054586.

Meng, C C; A Maleyki MJ and A Ismail, 2009. Phenolic and Theobromine Content of Commercial Dark, Milk and White Chocolate on the Mlaaysian Market, Molecules 14 ISSN 1420-3049, Article.

Misnawi. 2003. Influence of Cocoa Polyphenols and Enzym Reactivation on the Flavour Development of Unfermented and Under-fermented Cocoa Benas. Doctor of Phylosophy. Universitas Putra Malaysia.

Mudenuti, N. V. de R., de Camargo, A. C., Shahidi, F., Madeira, T. B., Hirooka, E. Y., & Grossmann, M. V. E. (2018). Soluble and insoluble-bound fractions of phenolics and alkaloids and their antioxidant activities in raw and traditional chocolate: A comparative study. Journal of Functional Foods, 50, 164–171. doi:10.1016/j.jff.2018.10.003.

Namir, H., Hadžić, R., Malešević, I., Jurčević, M., Starčević, D. 2019. Application of thin layer chromatography for qualitative analysis of gunpowder in purpose of life prediction of ammunition. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 5(1):4–12. DOI: 10.15406/ijbsbe.2019.05.00144.

Osakabe, N., S. Baba, A. Yasuda, T. Iwamoto, M. Kamiyama, T.Takizawa, H.Itakura, K.Kondo. 20001. Daily Cocoa Intake Reduces The Susceptibility of Low-Density Lipoprotein to Oxidation as Demonstrated in Healthy Human Volunteers. Free Radical Research, 34, 93-99.

Passos, M.L.C., Saraiva, M.L.M.F.S. 2019. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, 135, 896–904. doi:10.1016/ j.measurement.2018.12

Rahimah, Endah Sayekti , Afghani Jayuska. 2013. Karakterisasi Senyawa Flavonoid Hasil Isolat Dari Fraksi Etil Asetat Daun Matoa (*Pometia pinnata* J.R.Forst &G.Forst). JKK, 2 (2): 84-89.

Rubiyo, Dewi, Y.A., Imran, Salim, A., Baharudin, Indrawanto, C., Ratule, M.T. 2020. Evaluation of yield and pest and disease resistance of cocoa clones in Kolaka District, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, Volume 21, Number 12, pp: 5698-5607.

Sarjono, P R., Putri, L D., Budiarti, C E., Mulyani, N S., Ngadiwiyana, Ismiyarto, Kusrini, D., Prasetya, N B A. 2019. Antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolite endophytic bacteria from papaya leaf (Carica papaya L.). IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 509 (2019) 012112, doi:10.1088/1757-899X/509/1/012112.

Smit, HJ, 2011. Theobromine and Pharmacology of Cocoa, Functional Food Centre, Oxford Brookes University, Headington Campus, Gipsy Lane, Oxford OX3OBP, UK.

Streule, S., Leischtfeld, S F., Galler, M., Schwenninger, S M. 2022. Monitoring of cocoa post-harvest process practices on a small-farm level at five locations in Ecuador. *Heliyon*, 8 (2022) e09628.

Suprapti dan Justus,E.L. 2014. Kajian Komponen Fungsional Biji Kakao Dari Sulawesi Selatan. JIHP, 9(1): 35-43, Juni.

Suryani, D dan Zulfebriansyah, 2007. Komoditas Kakao Potret dan Peluang Pembiayaan, Economic Review No. 210 Desember 2007.

Widia, P. 1996. Penurunan Kadar Flavonoid dari Biji Kakao Fermentasi (*Theobroma cacao L.).* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro. Semarang.

Yamagishi M, Natsume M, Nagaki A, Adachi T, Osakabe N, Takizawa T, Kumon H, Osawa T. 2000. Antimutagenic Activity of Cacao: Inhibitory Effect of Cacao Liquor Polyphenols on the Mutagenic Action of Heterocyclic Amines. J. Agric Food Chem, 48: 5074-5078.