

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSAN EKSTRAK
ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
MENGUNAKAN METODE ABTS DAN PENETAPAN
KADAR FLAVONOID TOTALNYA**

SKRIPSI



Oleh:

Atika Syahara Putri

165010042

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2020**

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSAN EKSTRAK
ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
MENGUNAKAN METODE ABTS DAN PENETAPAN
KADAR FLAVONOID TOTALNYA**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat
dalam mencapai derajat Sarjana Farmasi
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Wahid Hasyim**

Oleh:

Atika Syahara Putri

165010042

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2020**

INTISARI

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSAN EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz) MENGGUNAKAN METODE ABTS DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTALNYA

Radikal bebas merupakan molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tak berpasangan pada orbital luarnya sedangkan antioksidan adalah molekul yang bersifat dapat menarik elektron radikal bebas, Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini untuk menentukan aktivitas antioksidan fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong menggunakan metode ABTS dan penetapan kadar flavonoid totalnya.

Ekstraksi serbuk daun singkong dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak etanol daun singkong dilakukan fraksinasi bertingkat menggunakan *n*-heksan dan air sehingga didapat fraksi *n*-heksan dan fraksi air. Fraksi *n*-heksan inilah yang akan diuji aktivitas antioksidan menggunakan senyawa ABTS dan ditetapkan kadar flavonoid totalnya menggunakan metode kolorimetri yang dibaca pada spektrofotometri UV-VIS selanjutnya hasil dihitung dengan regresi linear.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 105,936 ppm dan kadar flavonoid total sebesar 9,511 mgRE/g. Fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong memiliki aktivitas antiosidan dan kadar flavonoid total.

Kata kunci: Daun singkong, Flavonoid total, Antioksidan, Metode ABTS

ABSTRACT

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF N-HEXANE FRACTION OF SINGKONG LEAF ETHANOL EXTRACT (*Manihot esculenta* Crantz) USING ABTS METHOD AND DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID LEVELS

*Free radicals are molecules that have one or more unpaired electrons in their outer orbitals while antioxidants are molecules that can attract radical electrons. Cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) use flavonoids which are antioxidants. The purpose of this study is to determine the antioxidant activity of the n-hexane fraction of cassava leaf with ethanol extract using the ABTS method and determination of total flavonoid levels.*

Cassava leaves powder was extracted by maceration with 96% ethanol as solvent. Maserate is concentrated using a rotary evaporator until a thick extract is obtained. Ethanol extract of cassava leaves was carried out stratified fraction, using n-hexane and water to obtain the n-hexane fraction and water fraction. This n-hexane fraction will be tested for antioxidant activity using ABTS compounds and its total flavonoid levels are determined using the colorimetric method that is read on UV-VIS spectrophotometry and then the results are calculated by linear regression.

The results showed that the n-hexane fraction of cassava leaves ethanol extract had antioxidant activity with IC_{50} values of 105,936 ppm and total flavonoid levels of 9,511 mgRE / g. The n-hexane fraction of cassava leaves ethanol extract has antioxidant activity and total flavonoid levels.

Keywords: Daun Singkong, Total Flavonoids, Antioxidants, ABTS Method

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSAN EKSTRAK
ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
MENGUNAKAN METODE ABTS DAN PENETAPAN
KADAR FLAVONOID TOTALNYA**

oleh:
Atika Syahara Putri

165010042

**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim
Pada tanggal: 07 Maret 2020**

Pembimbing,



(Anita Dwi Puspitasari, S.Si., M.Pd)

Mengetahui:

Fakultas Farmasi
Universitas Wahid Hasyim
Dekan,



(apt. Aanes Budiarti, SF., M.Sc)

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Atika Syahara Putri
NIM : 165010042
Judul Skripsi : Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksan Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Menggunakan Metode ABTS dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya.

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi saya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah skripsi saya dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Demikian surat pernyataan ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 16 Februari 2020



Atika Syahara Putri

“Allah yang meninggikan langit tanpa tiang (sebagaimana) yang kamu lihat, kemudian Dia bersemayam diatas ‘Arsy. Dia menundukkan matahari dan bulan, masing-masing beredar menurut waktu yang telah ditentukan. Dia mengatur urusan (makhluk-Nya), dan menjelaskan tanda-tanda (kebesaran-Nya), agar kamu yakin akan pertemuan dengan Tuhanmu.” (Q.S. Ar-Ra’d ; 2)

Kupersembahkan untuk:

- ❖ *Kedua orang tuaku tercinta, bapak ir. Harir dan ibu Tirah atas segala doa,kesabaran dan perjuangannya.*
- ❖ *Kakak dan adik- adikku tercinta*
- ❖ *Almamater sebagai wujud terima kasih dan khidmahku*

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah swt atas segala karunia, nikmat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksan Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Menggunakan Metode ABTS dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya” . skripsi ini disusun untuk memenuhi syarat untuk dapat menyelesaikan program study farmasi strata 1 (S1) difakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang sudah membimbing, mengarahkan dan mendukung jalannya penelitian dan penyusunan skripsi. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Ibu apt.Aqnes Budiarti, SF., M.Sc₂ selaku dekan fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
2. Ibu Anita Dwi Puspitasari, S.Si, M.Pd selaku dosen pembimbing yang bersedia meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, nasihat motivasi dalam proses penelitian maupun penyusunan skripsi.
3. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang yang telah bersedia mengajarkan pengetahuan sebagai ilmu dasar dalam melakukan penelitian skripsi ini.
4. Seluruh Staf Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang yang telah mengizinkan dan membantu penulis untuk melakukan penelitian dilaboratorium.

5. Ibu apt. Aqnes Budiarti, SF., M.Sc. selaku penguji 1 yang telah memberikan arahan, masukan, dan saran untuk penulis menyempurnakan skripsi ini.
6. Ibu apt. Maria Ulfah, SF., M.Sc. selaku penguji 2 yang telah memberikan arahan, masukan, dan saran untuk penulis menyempurnakan skripsi ini.
7. Teman kelompok penelitianku Serli Adi Arviani, Maftuhatul Ulya, Tito Yusyac Maulana yang telah berjuang bersama dalam melakukan penelitian ini.
8. Sahabatku Aini Safitri, Aprilia Setya Ningrum dan Ardhina Tiara Savitri yang selalu memberikan dukungan dan semangat.
9. Teman-teman farmasi angkatan 2016 terutama untuk farmasi A yang telah menemaniku dalam menuntut ilmu dan banyak melewati suka duka bersama.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu sehingga skripsi ini dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan terutama dalam bidang antioksidan.

Semarang, 16 Februari 2020



Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
INTISARI	ii
SURAT PERNYATAAN	iv
PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
E. Tinjauan Pustaka	4
F. Landasan Teori	12
G. Hipotesis	14
BAB II. METODE PENELITIAN	15
A. Bahan dan Alat yang Digunakan	15
1. Bahan	15
2. Alat	15
B. Jalannya Penelitian	15
1. Pengumpulan Bahan	19
2. Determinasi Tanaman	19
3. Pembuatan Serbuk Simplisia	19
4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Singkong	19
5. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Singkong	19
6. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS	19
7. Penetapan Kadar Flavonoid Total	22
C. Analisis Data	24

BAB III. Hasil Penelitian dan Pembahasan	26
A. Determinasi Tanaman	26
B. Pengumpulan Serbuk Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Singkong	26
C. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Singkong	27
D. Uji Aktivitas Antioksidan Daun Singkong	27
E. Penentuan Kadar Flavonoid Total Fraksi N-Heksan Ekstrak Etanol Daun Singkong	35
BAB IV. Kesimpulan dan Saran	41
A. Kesimpulan	41
B. Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Tingkat kekuatan antioksidan.....	10
Tabel II.	Hasil penentuan <i>operating time</i> ABTS	29
Tabel III.	Pengukuran aktivitas antioksidan rutin dengan metode ABTS.....	32
Tabel IV.	Pengukuran aktivitas antioksidan FNHEEDS dengan metode ABTS	33
Tabel V.	Perbandingan IC ₅₀ antara FNHEEDS dan rutin	35
Tabel VI.	Hasil penentuan <i>operating time</i> senyawa kompleks AlCl ₃ - rutin	37
Tabel VII.	Hasil penentuan kurva baku rutin.....	38
Tabel VIII.	Penetapan kadar flavonoid total	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Identifikasi daun singkong	5
Gambar 2. Struktur umum flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid	8
Gambar 3. Skema jalannya penelitian.....	24
Gambar 4. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum ABTS.....	28
Gambar 5. Oksidasi ABTS oleh kalium persulfat untuk menghasilkan kation radikal ABTS+ dan reaksinya dengan senyawa antiradikal (AOH).....	28
Gambar 6. Kurva persamaan regresi linier % aktivitas antioksidan rutin replikasi 1	31
Gambar 7. Kurva persamaan regresi linier % aktivitas antioksidan Fraksi n-heksan replikasi 3.....	32
Gambar 8. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum rutin	36
Gambar 9. Kurva baku rutin replikasi 3.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi identifikasi tanaman singkong.....	47
Lampiran 2. Perhitungan simplisia, ekstrak dan fraksi n-heksan daun singkong	50
Lampiran 3. Perhitungan ABTS 7,33mM dan K ₂ S ₂ O ₈ 2,45mM.....	51
Lampiran 4. Pembuatan larutan induk rutin.....	53
Lampiran 5. Pembuatan larutan stok fraksi n-heksan ekstrak etanol daun singkong	55
Lampiran 6. Penentuan panjang gelombang maksimum	57
Lampiran 7. Penentuan <i>operating time</i>	58
Lampiran 8. Data pengukuran aktivitas antioksidan.....	59
Lampiran 9. Hasil analisa regresi linier fraksi n-heksan ekstrak etanol daun singkong ...	61
Lampiran 10. Perhitungan larutan stok dan pengenceran sampel.....	62
Lampiran 11. Penentuan panjang gelombang maksimum	63
Lampiran 12. Penentuan <i>operating time</i> kompleks rutin + AlCl ₃	64
Lampiran 13. Penentuan kurva baku rutin	65
Lampiran 14. Perhitungan kadar flavonoid total fraksi n-heksan ekstrak etanol daun singkong.....	69
Lampiran 15 Dokumentasi.....	71
Lampiran 16. Surat keterangan telah menyelesaikan penelitian	75

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tak berpasangan pada orbital luarnya sedangkan antioksidan adalah atom atau molekul yang bersifat dapat menarik elektron radikal bebas dapat berasal dari polusi udara, pencemaran lingkungan dan logam berat yang mengganggu kelangsungan hidup sel. Senyawa radikal bebas dalam tubuh bisa terbentuk secara terus menerus bisa melalui proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, bisa juga akibat respons terhadap pengaruh luar tubuh seperti polusi lingkungan, ultraviolet, asap rokok dan lain-lain. Antioksidan terbagi atas dua jenis yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (Winarsi, 2007). Sumber antioksidan dapat diperoleh dari bahan alam contohnya daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan anggota famili Euphorbiaceae dijumpai banyak didaerah Asia, termasuk Indonesia. Bagian singkong yang umum dimanfaatkan oleh masyarakat adalah bagian umbi sementara pemanfaatan bagian daun masih terbatas sebagai sayuran terutama bagian pucuk, sedangkan daun bagian bawah sebagai pakan ternak. Flavonoid dan fenolik merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman dan memiliki banyak fungsi, salah satunya yaitu sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan menghambat aktivitas radikal bebas dalam tubuh dengan cara memberikan elektron pada molekul radikal bebas sehingga

molekul tersebut menjadi stabil (Hasim dkk., 2016). Penelitian Hasim dkk. (2016) juga menyebutkan ekstrak metanol daun singkong yang diekstraksi menggunakan metode maserasi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi menggunakan metode DPPH. Selain itu, hasil analisis komponen fitokimia ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menunjukkan ekstrak metanol daun singkong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, fenolik, dan saponin. Daun singkong banyak mengandung senyawa murni dari jenis flavonoid seperti rutin (Tsumbu dkk., 2011).

Berdasarkan Penelitian dari Verawati dkk. (2017) menggunakan daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). Hasil perbandingan tersebut yaitu metode maserasi menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih baik walaupun hasilnya tidak signifikan.

Penelitian dari Hanifa dkk. (2015) menggunakan fraksi daun paitan (*Tithonia Diversifolia* (Hemsley A. Gray). Hasil perbandingan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, ekstrak etanol dan fraksi air menunjukkan bahwa kadar flavonoid terbanyak yaitu pada fraksi n-heksan sebesar IC_{50} 3,874 ppm dikarenakan senyawa flavonoid lebih banyak terekstrak ke senyawa yang lebih non polar.

Aktivitas antioksidan flavonoid dari daun singkong menggunakan metode ABT. Pengujian ABTS dilakukan karena metode ini memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH dan dapat dipakai untuk menganalisa antioksidan pada makanan. Berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan antara DPPH

dan ABTS memiliki perbedaan mekanisme reaksinya. Pada DPPH kemampuan antioksidan suatu senyawa dilihat berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan hidrogen. Sedangkan pada uji ABTS kemampuan senyawa antioksidan berdasarkan kemampuan untuk menstabilkan senyawa radikal bebas dengan mendonorkan radikal proton. Terbukti dari hasil uji yang dilakukan (Fitriana dkk., 2015). Berdasarkan penelitian Mu'awwanah (2015) menyatakan bahwa fraksi n-heksan ekstrak etanol daun karika menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar 157.134 ppm maka tergolong antioksidan yang lemah.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka diketahui bahwa penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid total pada fraksi n-heksan ekstrak etanol daun singkong dengan metode ABTS belum pernah dilakukan sebelumnya dan penelitian ini merupakan pengembangan pengujian aktivitas antioksidan yang sebelumnya sudah diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka diperoleh rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki nilai aktivitas antioksidan dengan metode ABTS pada yang dinyatakan dengan IC_{50} ?
2. Berapakah kadar flavonoid total pada fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz)?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Mengetahui apakah fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ABTS yang dinyatakan dengan IC₅₀.
- b. Mengetahui kadar flavonoid total pada fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada peneliti lain mengenai penggunaan daun singkong sebagai sumber antioksidan alami dan dapat digunakan sebagai acuan oleh industri farmasi untuk mengolah daun singkong menjadi produk bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan.

E. Tinjauan Pustaka

1. Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan famili Euphorbiaceae dijumpai banyak di daerah Asia, termasuk Indonesia. Gambar daun singkong dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Daun singkong(dokumen pribadi)

Klasifikasi tanaman singkong sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Sub Kingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (Berkeping dua/ dikotil)
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>Manihot Esculenta</i> Crantz.(Singkong, ubi kayu, ketela pohon)

Menurut Restiani dkk. (2014) menyatakan tanaman singkong mampu beradaptasi secara luas di daerah yang beriklim tropis. Di Indonesia, tanaman ketela pohon dapat tumbuh dan berproduksi didaerah dataran rendah hingga

dataran tinggi, yakni pada ketinggian antara 10 sampai 1500 mdpl. Namun, pertumbuhan dan produksi optimal ketela pohon akan diperoleh didaerah yang memiliki suhu minimum 10°C, singkong memiliki morfologi yaitu batang berdiameter sedang (12-25mm). Permukaan beralur dengan batang berwarna kuning kehijauan dan tidak terdapat percabangan. Daun muda pada ubi ini berwarna hijau sedangkan daun tua berwarna hijau tua dan bagian tiap daun berukuran <5 dengan jumlah tiap daun 5-6 helai dengan ujung daun meruncing.

2. Khasiat dan Kandungan Kimia

Hasil analisis komponen fitokimia ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menunjukkan ekstrak metanol daun singkong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, fenolik, dan saponin. Flavonoid dan fenolik merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman dan memiliki banyak fungsi, yaitu sebagai aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi, dan antikanker (Hasim dkk. 2016).

3. Ekstraksi

Ekstraksi ini merupakan proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga dapat terpisah dari bahan yang tidak dapat larut menggunakan pelarut cair. Simplisia mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin dan lain-lain (Depkes RI, 2000).

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi. Istilah maserasi berasal dari bahasa latin "macerare" yang memiliki arti mengairi, melunakkan, merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Waktu maserasi umumnya 3-5 hari, setelah waktu tersebut keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan luar sel telah tercapai. Pengadukan dilakukan agar cepat mendapat kesetimbangan antara bahan yang diekstraksi dalam bagian sebelah dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan. Keadaan diam tanpa pengocokan selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Semakin besar perbandingan serbuk terhadap cairan ekstraksi, akan semakin baik hasil yang diperoleh setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan atau remaserasi selama 2-3 hari (Voigt, 1994).

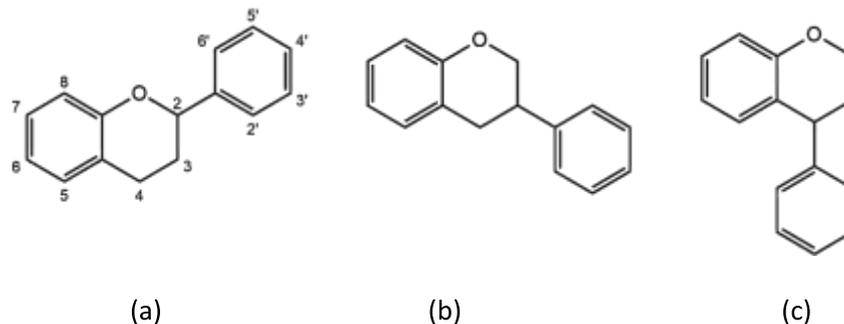
4. Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak dilakukan secara partisi cair-cair dengan menggunakan campuran dua pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda. Campuran pelarut adalah campuran *n*-heksan : air. Ekstak etanol dengan berat tertentu dilarutkan dalam air dengan volume tertentu sehingga ekstrak terlarut semuanya, kemudian *n*-heksan dengan volume tertentu ditambahkan untuk melarutkan ekstrak yang terlarut dalam pelarut non polar. Campuran tersebut dimasukkan kedalam corong pisah dan dikocok kuat-kuat hingga diperoleh lapisan air dan lapisan *n*-heksan, kedua lapisan kemudian dipisahkan, Lapisan *n*-heksan kemudian diuapkan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi

n-heksan. Sifat *n*-heksan dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar (Hikmah, 2012).

5. Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Flavonoid merupakan salah satu jenis komponen yang terkandung dalam tanaman, dan dapat ditemukan pada semua tanaman. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, buah, dan biji. Flavonoid memiliki 3 sifat yaitu polar, semi polar dan non polar. Flavonoid yang bersifat non polar adalah isoflavon, flavanon, flavon serta flavonol (Markham, 1988). Bergantung pada posisi ikatan dari cincin aromatik benzena pada rantai penghubung tersebut, kelompok flavonoid dibagi menjadi 3 kelas utama yaitu flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid. Struktur umum flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur umum (a) flavonoid, (b) isoflavonoid dan (c) neoflavonoid (Suhartono, 2016)

6. Rutin

Rutin atau kuersetin 3-rutinosida pertama kali diisolasi dari *fagopyrum esculentum* dan sampai sekarang tumbuhan ini masih menjadi sumber rutin

niaga. Tidak diragukan lagi rutin paling luas penyebarannya dan mungkin terdapat 25% dari flora setempat. Biasanya mudah diperoleh dari bunga magnolia, viola, dan aesculus hippocastanum, daun tembakau rheum, teh dan phaseolus vulgaris. Rutin adalah suatu glikosida hasil kondensasi aglikon kuersetin dengan gula rutinosa. Warna yang didapat pada pembacaan UV senyawa rutin dengan penambahan ammonia menghasilkan warna coklat redup atau kuning tua (Harborne, 1987). Tsumbu dkk. (2011) juga berhasil mengidentifikasi senyawa rutin dalam daun singkong yang diperkirakan merupakan senyawa yang berperan dalam penghambatan aktivitas radikal bebas.

7. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron atau elektron donor. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya kerusakan sel terhambat. Suatu proses yang mencegah terjadinya reaksi oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2007). Menurut Blois, (1958) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan diukur dari nilai IC₅₀ berikut adalah tingkat kekuatan antioksidan yang dapat dilihat pada Tabel I.

Tabel I. Tingkat kekuatan antioksidan

Intensitas antioksidan	Nilai IC ₅₀ (ppm)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	100-250
Lemah	250-500
Tidak aktif	>500

7. Metode ABTS

Metode ABTS memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode lain, yaitu pengujian sederhana, mudah diulang, menggunakan alat yang sederhana dan yang paling penting adalah fleksibel dan dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yang bersifat hidrophilik maupun lipophilik dalam ekstrak makanan dan cairan (Apak dkk., 2007). Metode ABTS lebih baik dibandingkan dengan metode DPPH, karena metode ABTS memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH (Fitriana dkk., 2015).

Prinsip dari uji ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. Radikal kation ABTS akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas dan menjadi ABTS yang lebih stabil atau senyawa tidak radikal.

8. Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid. Cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Disamping itu, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi kedalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988). Prinsip kerja Spektrofotometer UV-Vis yaitu apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi dipancarkan. Adapun yang melandasi pengukuran spektrofotometer ini dalam penggunaannya adalah hukum Lambert-Beer yaitu bila suatu cahaya monokromatis dilewatkan melalui suatu media yang transparan, maka intensitas cahaya yang ditransmisikan sebanding dengan tebal dan kepekaan media larutan yang digunakan. Berdasarkan persamaan berikut:

$$A = \frac{\log I}{I_0} \text{ atau } A = a \cdot b \cdot c \text{ (l)}$$

Keteranga:

A = absorbansi

a = koefisien serapan molar

b = tebal media cuplikan yang dilewati sinar

c = konsentrasi unsur dalam larutan cuplikan

I_0 = intensitas sinar mula-mula

I = intensitas sinar yang diteruskan (Fatimah, 2008).

F. Landasan Teori

Berdasarkan penelitian dari Hasim dkk. (2016) menyatakan bahwa uji fitokimia ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menunjukkan ekstrak metanol daun singkong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, fenolik, dan saponin. Penelitian dari Hasim dkk. (2016) juga menyebutkan bahwa ekstrak metanol daun singkong yang diekstraksi menggunakan metode maserasi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi menggunakan metode DPPH, dihasilkan nilai IC_{50} sebesar 92.10 mg/L.

Hasil uji aktivitas antioksidan daun singkong didapat nilai EC_{50} sebesar $4,617 \pm 0,2570$ mg/ml. Nilai ini menunjukkan konsentrasi ekstrak daun singkong yang diperlukan untuk menghilangkan 50% aktivitas DPPH (Puspitarini, 2010).

Menurut Tsumbu dkk. (2011) daun singkong banyak mengandung senyawa murni dari jenis flavonoid seperti rutin. Tsumbu dkk. (2011) juga berhasil mengidentifikasi senyawa rutin dalam daun singkong yang diperkirakan merupakan senyawa yang berperan dalam penghambatan aktivitas radikal bebas.

Rutin yang terdapat dalam daun singkong tersebut disari dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Digunakan ekstraksi maserasi karena pada perendaman dan penggojogan dalam proses maserasi menyebabkan adanya perbedaan konsentrasi rutin didalam serbuk

daun singkong dengan pelarut sehingga rutin yang larut dalam pelarut akan berdifusi keluar ke pelarutnya (Sari, 2010). Digunakan pelarut etanol 96% karena rutin memiliki kelarutan yang baik terhadap etanol, sehingga dari pelarut tersebut dapat mengoptimalkan tersarinya rutin dari serbuk daun singkong. Selain itu, etanol ditemukan lebih mudah untuk menembus membran seluler untuk mengekstraksi bahan intraseluler dari bahan tanaman. Sehingga dalam penelitian ini tidak menggunakan metanol karena metanol lebih polar daripada etanol tetapi karena sifat sitotoksikannya, metanol tidak cocok untuk ekstraksi dalam jenis studi tertentu karena dapat menyebabkan hasil yang salah (Tiwari dkk., 2011).

Berdasarkan Penelitian dari Hanifa dkk. (2015) menggunakan fraksi daun paitan (*Tithonia Diversifolia* (Hemsley A. Gray). Hasil perbandingan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, ekstrak etanol dan fraksi air menunjukkan bahwa kadar flavonoid terbanyak yaitu pada fraksi n-heksan sebesar IC_{50} 3,874 ppm dikarenakan senyawa flavonoid lebih banyak terekstrak ke senyawa yang lebih non polar.

Hasil penelitian dari Fitriana dkk. (2015) menunjukan Metode ABTS lebih baik dibandingkan dengan metode DPPH karena metode ABTS memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada metode DPPH. metode ABTS dan DPPH juga memiliki Mekanisme yang berbeda yaitu pada metode DPPH kemampuan antioksidan suatu senyawa dilihat berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan hidrogen. Sedangkan pada uji ABTS kemampuan senyawa antioksidan berdasarkan kemampuan senyawa

antioksidan untuk menstabilkan senyawa radikal bebas dengan mendonorkan radikal proton. Penelitian ini merupakan pengembangan pengujian aktivitas antioksidan pada daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang sebelumnya telah diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH. Berdasarkan penelitian Mu'awwanah (2015) menyatakan bahwa fraksi n-heksan ekstrak etanol daun karika menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC₅₀ sebesar 157.134 ppm maka tergolong antioksidan yang lemah.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka diketahui bahwa penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid total pada fraksi n-heksan ekstrak etanol daun singkong dengan metode ABTS belum pernah dilakukan sebelumnya dan penelitian ini merupakan pengembangan pengujian aktivitas antioksidan yang sebelumnya sudah diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori tersebut, maka dapat diperoleh hipotesis yaitu :

- a. Fraksi *n*-Heksan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antioksidan.
- b. Fraksi *n*-Heksan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki kandungan Flavonoid dengan kadar tertentu.

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat yang Digunakan

1. Bahan

Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diperoleh dari Kelurahan Sampangan, Kecamatan Gajah Mungkur, Kota Semarang, Jawa Tengah. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 96% teknis (Merck). Bahan yang digunakan untuk fraksinasi adalah *n*-heksan. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah ABTS (2,2 – Azinobis (3-Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid) p.a (Merck), kalium persulfat ($K_2S_2O_8$), rutin, etanol p.a (Merck), methanol p.a (Merck), aquadest. Bahan yang digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total adalah rutin (Sigma), pereaksi $AlCl_3$ 10% (Merck), CH_3COOK , etanol p.a (Merck), methanol p.a (Merck).

2. Alat

Seperangkat alat ekstraksi yang terdiri dari seperangkat alat gelas (Iwaki Pyrex), perangkat maserasi, penyerbuk elektrik, timbangan elektrik (Ohaus), *moisture balance* (Ohaus), vacuum, corong buchner, oven, *rotary evaporator* (Heidolph). Seperangkat alat penetapan kadar flavonoid total dan uji aktivitas antioksidan adalah seperangkat alat gelas (Iwaki Pyrex), Spektrofotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu), dan mikropipet.

B. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan Bahan

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang digunakan pada penelitian ini berupa bagian daun singkong. Berwarna hijau yang muda dan segar yaitu

dari ujung batang muda. Menurut penelitian solikhah dkk., (2019) menyatakan bahwa sampel daun singkong yang digunakan yaitu daun singkong yang terletak pada posisi ketiga sampai ke tujuh dari pucuk tanaman.

2. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan untuk mengetahui identitas tumbuhan yang digunakan pada penelitian, yaitu Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Determinasi dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistematika, Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro Semarang.

3. Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun singkong yang baru dipetik disortasi dan dicuci dengan air bersih mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel, kemudian ditiriskan lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C sampai kering selama kurang lebih 3 jam dengan ciri-ciri daun singkong mudah hancur jika diremas. Daun singkong yang sudah kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara diblender dan diayak dengan menggunakan penyerbuk elektrik serta diukur kadar airnya dengan alat *moisture balance* (Nisa dkk.,2013). Persyaratan kadar air pada simplisia kering sebelum dilakukan proses penyarian yaitu kurang dari 10%. Serbuk yang diperoleh kemudian disimpan ditempat yang tidak terkena sinar matahari supaya tidak terjadi dekomposisi kandungan senyawa dan diberi silica gel agar dapat tahan lama (Depkes RI, 1985).

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Singkong

Serbuk simplisia daun singkong sebanyak 1 kg diekstraksi menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia dimasukkan kedalam toples kaca yang bersih dan kering kemudian ditambah pelarut etanol 96% sebanyak 7500 ml sebagai proses maserasi sebagai penyari. Toples kaca ditutup rapat dan diletakkan pada tempat yang terlindung dari cahaya. Campuran tersebut didiamkan selama 4 hari dengan pengadukan 2 kali sehari, kemudian campuran etanol 96% dan serbuk daun singkong disaring. Hasil dari penyaringan ini disebut hasil maserasi atau maserat I. Ampas hasil penyaringan diremaserasi dengan etanol 96% sebanyak 2500 ml dan diletakkan pada tempat yang terlindung dari cahaya. Campuran didiamkan selama 2 hari dengan pengadukan 2 kali sehari, kemudian campuran etanol 96% dan serbuk daun singkong disaring. Hasil dari penyaringan ini disebut hasil remaserasi atau maserat II.

Hasil maserasi dan remaserasi yang didapatkan kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan kecepatan 60 rpm sampai tidak ada etanol yang menetes dan didapatkan ekstrak kental (Nisa dkk., 2013). Setelah diperoleh ekstrak kental daun singkong, randemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

Randemen =

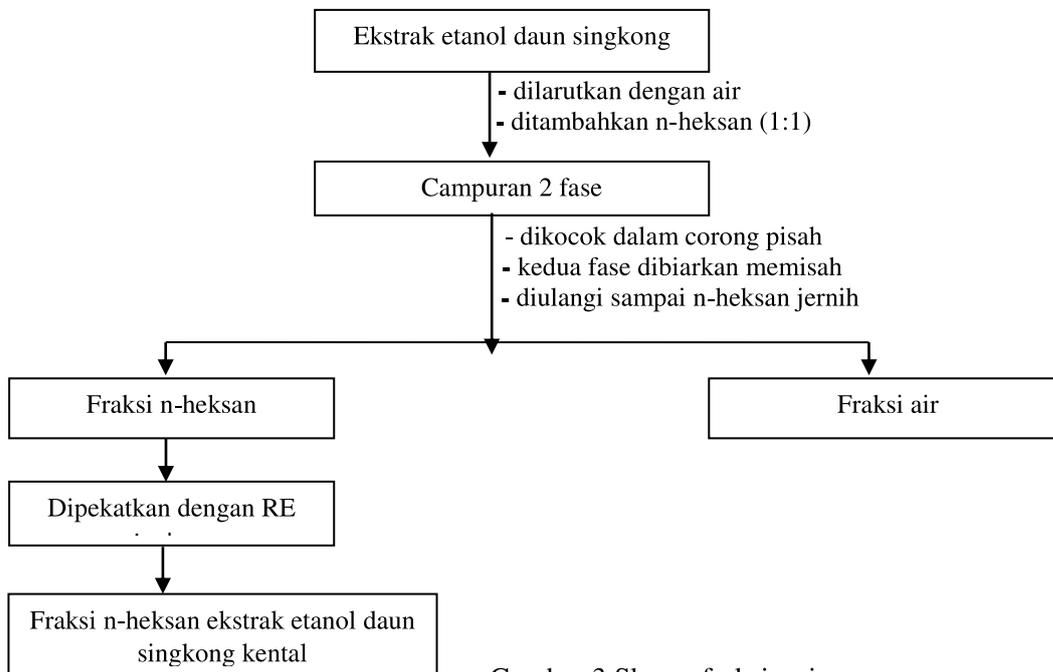
$$\frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

Ekstrak yang didapatkan kemudian disimpan guna mempertahankan kualitas fisik dan kestabilan kandungan senyawa aktif sehingga tetap memenuhi persyaratan mutu. Ekstrak kental ditimbang dan dimasukkan dalam gelas yang dilapisi kertas gelap kemudian disimpan dalam destikator guna mempertahankan kualitas fisik dan kestabilan kandungan senyawa aktif sehingga memenuhi persyaratan mutu (Depkes RI, 1986). Ekstrak daun singkong berbentuk kental, berwarna hijau pekat dengan bau khas daun singkong, serta memiliki rasa agak sepat.

5. Fraksinasi ekstrak etanol 96% daun singkong

Fraksinasi ekstrak etanol daun singkong dilakukan secara partisi cair-cair dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak etanol daun singkong sebanyak 20 g dilarutkan dalam 200 mL air hingga larut sempurna. Kemudian ekstrak tersebut ditambahkan 200 mL *n*-heksan corong pisah. Campuran digojog hingga terbentuk 2 lapisan dan dipisahkan fase-fase yang terbentuk. Sisa fase air ditambah 200 mL *n*-heksan dan digojog hingga terjadi pemisahan kembali. Dilakukan cara yang sama hingga fase dari *n*-heksan yang ditambahkan jernih (tidak ada zat yang tersari). Hasil fraksinasi diuapkan dengan *rotary evaporator*. Randemen ditimbang bobot ekstrak kentalnya dan dicatat sebagai bobot fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun singkong. Fraksi *n*-heksan ditentukan aktivitas antioksidannya dengan metode ABTS (Hikmah, 2012).

Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema fraksinasi

6. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS

a. Pembuatan Larutan Blanko ABTS

Pembuatan larutan blanko ABTS, dilakukan dengan cara serbuk ABTS ditimbang sebanyak 100,5 mg dilarutkan dengan aquadest sebanyak 25 mL (7,33mM) dan dibuat larutan $K_2S_2O_8$ sebanyak 165,56 mg ditambahkan aquadest sebanyak 250 mL (2,45mM). Kedua larutan tersebut dicampur kemudian diselubungi dengan aluminium foil agar tidak terkena cahaya matahari. Selanjutnya diinkubasi selama 6 jam hingga tercampur rata agar reaksi yang terjadi dapat sempurna (Lee dkk., 2006).

b. Pembuatan Larutan Induk Rutin (400,4 $\mu\text{g/ml}$)

100,1 mg rutin ditimbang lalu dilarutkan dengan metanol hingga larut. Larutan tersebut dimasukkan dalam labu takar 250 mL, ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas .

c. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Sampel

Fraksi n-heksan ekstrak etanol daun singkong ditimbang 100,2 mg, kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml metanol (1002 ppm), dibuat seri kadar (5, 10, 20, 40 dan 80 ppm) (Sami dan Rahimah, 2016).

d. Penentuan Panjang Gelombang (λ) maksimum

Penentuan λ maksimum dilakukan dengan cara 3 ml larutan ABTS diukur absorbansi larutan pada spektrofotometer dengan rentang panjang gelombang 400-800 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah aquadest (Sami dan Rahimah, 2016).

e. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara diambil larutan rutin 75 μ l kemudian ditambah ABTS 1 mL. kemudian dicukupkan volumenya sampai 5mL dengan etanol p.a. Larutan dihomogenkan dengan cara divortex selama 30 detik dan diukur pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 pada λ maksimum. Waktu peredaman radikal ABTS yang menghasilkan absorbansi paling stabil dan memberikan serapan paling tinggi merupakan *operating time*. Serapan yang tinggi menunjukkan sampel sudah bereaksi dengan sempurna (Sami dan Rahimah, 2016).

f. Pengukuran Serapan Larutan Blanko ABTS

Larutan blanko ABTS dipipet sebanyak 1 ml dan dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol p.a. dalam labu ukur. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Sami dan Rahimah, 2016).

g. Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS

1) Uji Aktivitas Antioksidan Rutin

Larutan pembanding rutin 400 ppm dipipet masing-masing 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl dan 500 µl, campuran ditambah 1 ml larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol p.a. sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Selanjutnya dihomogenkan lalu didiamkan ditempat gelap selama *operating time* selanjutnya diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus (Sami dan Rahimah, 2016) :

$$\% \text{ Daya antioksidan} = \left(\frac{\text{abs blanko} - \text{abs sampel}}{\text{abs blanko}} \right) \times 100 \%$$

2) Uji Aktivitas Antioksidan Daun Singkong

Larutan stok sampel ekstrak etanol daun singkong 1002 ppm dipipet masing-masing 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl dan 250 µl, campuran ditambah 1 ml larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol p.a. sehingga diperoleh larutan dengan

konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm dan 80 ppm. Selanjutnya dihomogenkan lalu didiamkan ditempat gelap selama *operating time* selanjutnya diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus (Sami dan Rahimah, 2016) :

$$\% \text{ Daya antioksidan} = \left(\frac{\text{abs blanko} - \text{abs sampel}}{\text{abs blanko}} \right) \times 100 \%$$

7. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Induk Rutin (400 ppm)

100,1 mg rutin ditimbang lalu dilarutkan dengan metanol hingga larut. Larutan tersebut dimasukkan dalam labu takar 250 mL, ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas.

b. Pengukuran Panjang Gelombang (λ) Maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan membuat larutan rutin pada konsentrasi 6 ppm. Ditambahkan AlCl_3 dan Kalium Asetat. Larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer visibel pada lamda 400-800 nm dengan nilai absorbansi larutan antara 0,2-0,8. (Wahyulianingsih dkk., 2016)

c. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* atau waktu operasional dilakukan dengan membuat larutan rutin pada konsentrasi 6 ppm. Ditambahkan AlCl_3 dan

Kalium Asetat. Larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum dengan waktu pengukuran pada menit ke 5,10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60. Penentuan *operating time* ditentukan dengan melihat nilai absorbansi yang stabil pada hasil pengukuran (Wahyulianingsih dkk., 2016).

d. Pembuatan Kurva Baku Rutin

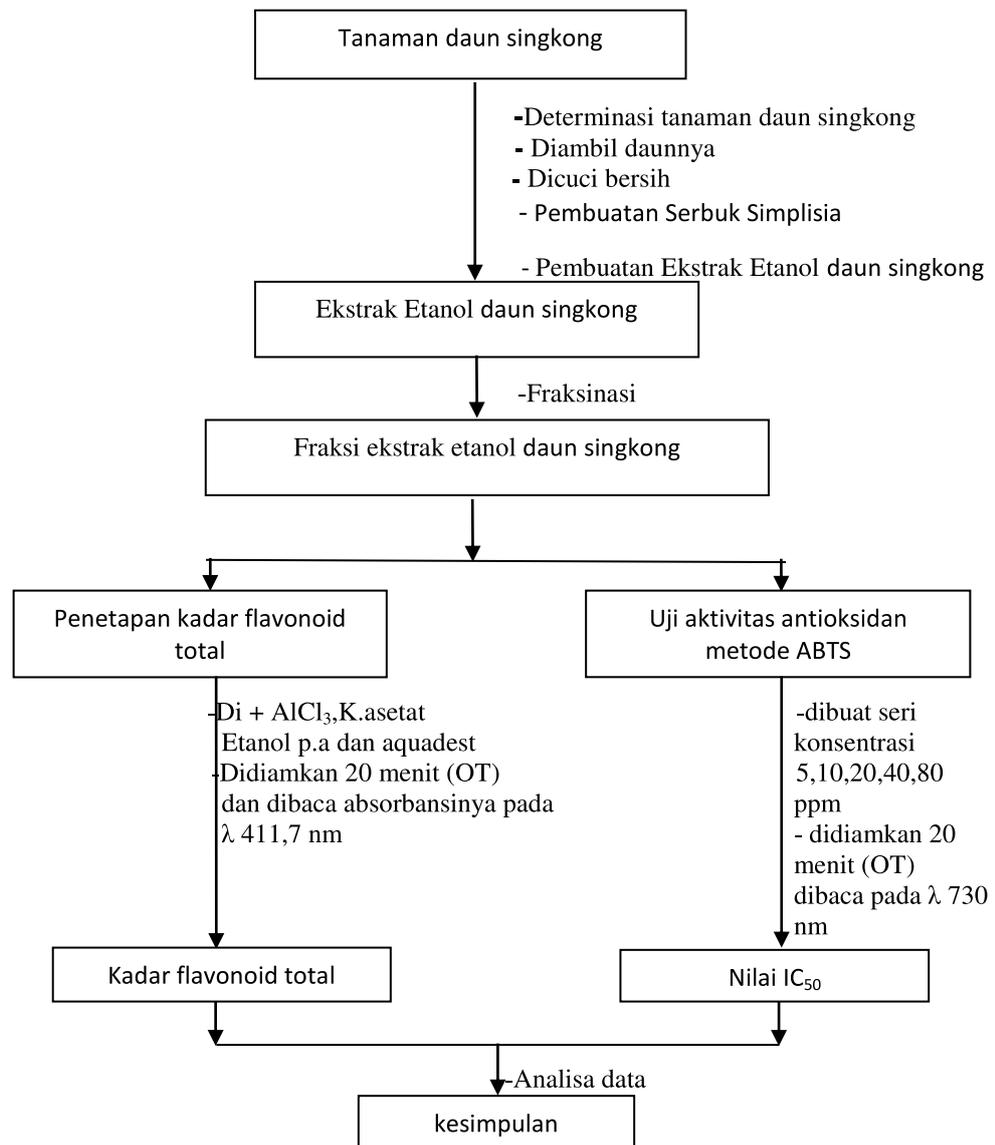
Pembuatan kurva baku dilakukan dengan membuat larutan rutin pada seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Seri konsentrasi rutin 2 ppm dibuat dengan cara mengambil larutan standar rutin 25 μ L dengan menggunakan mikropipet kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas 5 mL. Pembuatan seri konsentrasi 4, 6, 8, dan 10 ppm dilakukan sama seperti pada konsentrasi 2 ppm. Larutan tersebut kemudian diukur dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum (Manik dkk., 2014).

e. Pengukuran Flavonoid Total

Analisis kuantitatif flavonoid total pada ekstrak cair daun singkong dilakukan dengan metode spektrofotometri Visibel menggunakan pereaksi alumunium klorida (AlCl_3). Larutan induk fraksi n-heksan ekstrak etanol daun singkong diambil sebanyak 0,2 mL ditambah 0,1 mL AlCl_3 10%; 0,1 ml Kalium Asetat 1M; 3,7 mL etanol p.a. dan ditambahkan aquadest hingga 5 mL. Larutan tersebut didiamkan selama *operating time* pada menit ke 20

kemudian diukur dengan spektrofotometer visibel pada lamda maksimum (Manik dkk, 2014).

Skema jalannya penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Skema jalannya penelitian

C. Analisis Data

1. Uji Aktivitas Antioksidan

Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi dari ekstrak etanol fraksi *n*-heksan daun singkong kemudian dihitung persentase aktivitas antioksidannya dengan rumus (Samin dkk., 2013) :

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{abs blangko} - \text{abs sampel}}{\text{abs blangko}} \times 100 \% \quad (1)$$

Keterangan :

Abs blangko = absorbansi ABTS

Abs sample = absorbansi seri konsentrasi etanol 96% daun singkong

Data dianalisis menggunakan regresi linier antara seri konsentrasi (x) dan % aktivitas antioksidan (y). Nilai IC₅₀ diperoleh ketika y bernilai 50.

2. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi dari ekstrak etanol fraksi *n*-heksan daun singkong dihitung kadar flavonoid total dengan memplotkan nilai absorbansi sampel ekstrak ke dalam persamaan kurva baku rutin. Flavonoid total dihitung dengan rumus (Samin dkk., 2013):

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{C \times V \times fp}{g} \quad (2)$$

Keterangan: C = Konsentrasi Flavonoid (nilai X)

V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)

Fp = Faktor Pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

HALAMAN INI TIDAK TERSEDIA

BAB III

DAPAT DIAKSES MELALUI

UPT PERPUSTAKAAN UNWAHAS

BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan :

1. Fraksi n- Heksan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta Crantz.*) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 105,936 µg/mL yang menunjukkan aktivitas antioksidan sedang.
2. Fraksi n- Heksan ekstrak etanol daun singkong memiliki kadar flavonoid total sebesar 9,511 mgRE/g sampel menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis.

B. Saran

Saran dari penelitian ini adalah :

1. Hasil fraksi n-heksan kecil, mungkin bisa digunakan pelarut yang lebih rendah grade kepolarannya contohnya menggunakan kloroform.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang kandungan senyawa lain yang terdapat dalam tanaman singkong yang berpotensi sebagai antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker K.I., dan Ozyurt, D., 2007, Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds With The CUPRAC Assay, *Molecules*, 12, 7, 1496-547.
- Backer, CA, RCB Van Den Brink, 1963, Flora of Java. Volume I (III). NV. Noordroff, Groningen, The Netherlands.
- Blois M.S., 1958, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 18, 1199-1200
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., dan Chern, J.C., 2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1985, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Cetakan Pertama, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1-11.
- Fardah, U.J., 2018, Uji Aktivitas Antioksidan Perasan Jeruk Purut (*Citrus Hystrix*) dengan Metode ABTS dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya, Skripsi, Universitas Wahid Hasyim , Semarang
- Fatimah, Syamsul., 2008, Kinerja Spektrofotometer Uv-Vis Menggunakan Metode Quality Control Chart. PTBN-Batan
- Fitriana, W.D., Ersam, T., dan Fatmawati, S., 2015, Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-Fraksi Daun Kelor (*Moringa oleifera*), *Prosiding Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains 2015 (SNIPS 2015)*, Bandung, Indonesia.
- Gandjar, I.G., dan Rohman , A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta
- Gandjar, I.G., dan Rohman , A., 2013, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Hanifa, R.A., Lukmayani, Y., dan Syafnir, L., 2015, Uji Aktivitas Antioksidan Serta Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak dan Fraksi Daun Paitan (*Tithonia Diversifolia* (Hemsley) A. Gray), Fakultas MIPA, Universitas Islam Bandung, Bandung.

- Harbone. J.B. 1987, Metode Fitokimia, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwan Sudiro, Cetakan Kedua Institute Teknologi Bandung.
- Hasim., Falah, S., dan Dewi,K., 2016, Pengaruh Perebusan Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz*) terhadap Kadar Total Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidannya, Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor
- Hikmah, F.D., 2012, Pengaruh Partisi Bertingkat Cair-Cair Ekstrak Etanol Rimpang Jahe (*Zingiber Officinale Rosc.*) Terhadap Profil Kandungan Senyawa Kimia dan Aktivitas Antiradikalnya; 1–17.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L., 2005, The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, Reviews, *J Agric Food Chem*, 53: 1841-1856.
- Khasanah, I., Ulfah, M., dan Sumantri, 2014, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil), *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 11.
- Lee, B.W., Lee, J.H., Gal, S.W., Moon, Y.H., and Park, K.H., 2006, Selective ABTS Radical-Scavenging Activity of Prenylated Flavonoids from *Cudrania tricuspidata*, *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2, 427–432.
- Manik, D.F., Hertiana, T. dan Anshory, H., 2014, Anaisis Korelasi antara Kadar Flavonoid dengan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi-Fraksi Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Khazanah*, 6, 2, 1-11.
- Markham, K.R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 15, Penerbit ITB, Bandung, hal 1-15.
- Mu'awwanah, A., Ulfah, M., 2015, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Ekstrak Etanol Daun Karika (*Carica Pubescens*) dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dan Flavonoidnya, Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang
- Nisa, V.M., Meilawaty, Z, dan Astuti,P., 2013, Efek Pemberian Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Terhadap Proses Penyembuhan Luka Gingiva Tikus (*Rattus Norvegicu*), 1-7.
- Oliveira, S.D., Souza, G.A., Eckert, C.R., Silva, T.A., Sobral, E.S., Favero, O.A., Ferreira, M.J.P., Romoff, P., and Baader, W.J., 2006, Evaluation of Antiradical Assays Used Indetermining The Antioxidant Capacity of Pure Compounds and Plant Extracts, *Quim Nova*, **37**, 3, 497-503.
- Puspitarini, 2010, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot folium*) Menggunakan Metode Diphenylpryeil Hidrazil DPPH, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Darma, Yogyakarta

- Restiani, R., Roslim, D.I., dan Herman, 2014, Karakter Morfologi Ubi Kayu (*Manihot esculenta Crantz*) Hijau Dari Kabupaten Pelalawan, JOMFMIPA, 1(2):619-623.
- Sami, F.J., dan Rahimah, S., 2016, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica oleracea L. var. Italica*) dengan Metode DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan Metode ABTS (2,2 azinobis (3-ethylbenzotiazolin)-6-asam sulfonat), *J. Fitofarmaka Indonesia*, 2, 2, 107-110.
- Samin, A., Ahmad, Bialangi, dan Salimu, 2013, Penentuan Kandungan Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan dari Rambut Jagung (*Zea mays L.*) yang tumbuh di Daerah Gorontalo, *Jurnal Kimia dan pendidikan Kimia Fakultas Matematika dan IPA*, Universitas Negeri Gorontalo, Gorontalo.
- Sari, V.Y.C., 2010, optimasi komposisi etanol dan air dalam proses maserasi dan singkong (*manihotis folium*) dengan aplikasi simplex lattice design, Farmasi, Universitas Sanata Darma, Yogyakarta
- Suhartono, E., 2016, Toksisitas Oksigen Reaktif dan Antioksidan Dibidang Kedokteran dan Kesehatan, gosyen publishing, Yogyakarta
- Solichah, M., Sumantri., Puspitasari A. D., 2018, Uji Aktivitas Antioksidan Air Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia S.*) dengan Metode ABTS (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) Dan Pentapan Kadar Flavonoidnya.
- Tiwari, Kumar, Kaur, M, Gurprett dan Harlem, 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review Journal Inernational Pharmaceutica Scientia, 1(1).
- Tsumbu, C.N., Dupont, G.D., Tits. M., Angenot. L., Franck, T., Sertey, D., Mickalad, A.M., 2011. Antioksidant and antiradical activities of *Manihot esculenta Crantz* (Euphorbiaceae) leaves and other selected tropical green vegetables investigated on lipoperoxidation and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) activated monocytes. *Nutrients*. 3:818-838.
- Van Steenis, C.G.G.J., 1981, *Flora, Untuk Sekolah Indonesia*, PT. Pradnya Paramita, Jakarta
- Verawati, Nofandi, D., Petrmawati, 2017, Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Fenolat Total dan Aktivitas Antioksidan Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.), Kementerian Riset Teknologi Dan Pendidikan Tinggi Jurnal Katalisator Kopertis Wilayah X, Vol 2 No. 2 E-ISSN : 2502-0943.
- Voigt, R., 1994, Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, Edisi ke-5, Yogyakarta : Gajah Mada University Press.

Wahyulianingsih, Handayani, S., dan Malik A., 2016, Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry), *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, **3**, 2.

Winarsi, H., 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Penerbit Kanisius, (Agroinovasi Badan Litbang Pertanian)