

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

SKRIPSI



Oleh:

Serli Adi Arviani

165010046

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

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI AIR 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:

Serli Adi Arviani

165010046

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

INTISARI

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

Radikal bebas merupakan senyawa yang dapat menyebabkan penyakit degeneratif. Radikal bebas dapat diredam oleh senyawa antioksidan. Antioksidan alami yang dapat membantu melindungi tubuh dari radikal bebas yaitu daun singkong. Daun singkong diketahui mengandung senyawa flavonoid yang merupakan salah satu antioksidan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi air ekstrak etanol daun singkong menggunakan metode ABTS dan penetapan kadar flavonoid totalnya.

Serbuk daun singkong di ekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol 96% sehingga diperoleh ekstrak etanol daun singkong kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak yang dipekatkan kemudian difraksinasi menggunakan pelarut air. Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ABTS dilakukan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum 730 nm untuk memperoleh nilai IC_{50} menggunakan rutin sebagai kontrol positif dan penetapan kadar flavonoid total menggunakan pereaksi $AlCl_3$ dengan standar rutin yang hasilnya dinyatakan dalam ekuivalen rutin (mg RE/g sampel) kemudian hasilnya dihitung menggunakan regresi linear.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi air ekstrak etanol daun singkong memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 62,31 μ g/mL dan mengandung senyawa flavonoid total sebesar 39,62 mg RE/g. Fraksi air ekstrak etanol daun singkong memiliki aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid.

Kata kunci: Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz), Antioksidan, ABTS,

Flavonoid total

ABSTRACT

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WATER FRACTION OF ETHANOL EXTRACT OF CASSAVA LEAVES (*Manihot esculenta* Crantz) USING THE ABTS METHOD AND DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID LEVELS

Free radicals are compounds that can cause degenerative disease. Free radicals can be suppressed by antioxidant compounds. Natural antioxidant that can help protect the body from free radicals namely cassava leaves. Cassava leaves are known to contain flavonoid compounds which are one of the natural antioxidants. This study aims to determine the antioxidant activity of cassava leaves ethanol extracted water fraction using ABTS method and determination of total flavonoid levels.

Cassava leaf powder was extracted by maceration with 96% ethanol solvent so that the cassava leaf ethanol extract extract was obtained then concentrated with a rotary evaporator. The concentrated extract is then fractionated using a water solvent. Measurement of antioxidant activity with the ABTS method was performed using a UV-Vis spectrophotometer at a maximum wavelength of 730 nm to obtain IC₅₀ values using routine as a positive control and determination of total flavonoid levels using AlCl₃ reagents with routine standards whose results are expressed in routine equivalents then the results are calculated using linear regression.

The results showed that the ethanol extract fraction of water had strong antioxidant activity with an IC₅₀ value of 62.31 µg / mL and contained a total flavonoid compound of 39.62 mg RE / g. Water fraction of cassava leaf ethanol extract has antioxidant activity and flavonoid levels.

Keywords: *Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz), Antioxidants, ABTS, total flavonoids*

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

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

oleh:

Serli Adi Arviani
165010046

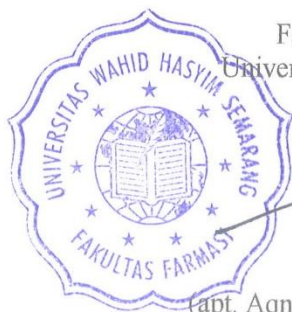
**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim
Pada tanggal: 7 Maret 2020**

Pembimbing,



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

Mengetahui:
Fakultas Farmasi
Universitas Wahid Hasyim
Dekan,



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

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Serli Adi Arviani

NIM : 165010046

Judul Skripsi : Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun
Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Menggunakan
Metode ABTS dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya.

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 saya buat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 20 Februari 2020



Serli Adi Arviani

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

أحلامي بين يديك يا الله فحققها

Mimpi-mimpiku ada digenggaman-Mu Ya Allah, Wujudkanlah...

Kupersembahkan karya ini dengan penuh rasa cinta teruntuk :

- *Orang tuaku tercinta, abah Sube'an dan mama Sulastri atas segala doa dan perjuangannya*
- *Kakak – kakakku Triyanto, Nurkhasanah, Muheri, Sustiharni dan Sela Ade Otaviana terimakasih untuk sayang dan semua yang telah diberikan untukku*
- *Segenap keluarga besarku tercinta.*
- *Almamater sebagai wujud terima kasih dan khidmahku*

KATA PENGANTAR

Segala Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Menggunakan Metode ABTS dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya” Sebagai syarat dalam mencapai gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.

Dalam penulisan Skripsi ini tentunya tidak akan berjalan dengan lancar tanpa adanya dukungan serta bimbingan dari berbagai pihak baik pada waktu penelitian ataupun pada saat penulisan. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Abah Sube'an dan Mama Sulastri atas ridho dan do'anya sehingga penulis dipermudah langkahnya dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Mas Tato, Demang, Mba Unung, Mas Edi, Mas Heri, Mba Mimin, Mba Tus, Mas Pur, kembaranku Sela Ade Otaviana (Aa) dan kesebelas keponakanku yang selalu memberi semangat, dukungan, nasehat dan segala perhatiannya.
3. Universitas Wahid Hasyim Semarang sebagai tempat kami menimba ilmu.
4. Ibu Aqnes Budiarti, M.Sc., Apt., selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.
5. Ibu Dr. Yulias Ninik W, M.Si., Apt, selaku Kaprodi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.

6. Ibu Anita Dwi Puspitasari, S.Si., M.Pd selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis dalam penulisan skripsi ini.
7. Ibu Aqnes Budiarti, M.Sc., Apt dan Ibu Maria Ulfah, M.Sc., Apt selaku dosen penguji yang telah bersedia menjadi dosen penguji dan memberikan saran serta kritik membangun bagi skripsi penulis.
8. Bapak Sugito Chandra, S.Farm dan Mas Wahid Muhaimin, S.Farm selaku laboran laboratorium kimia dan laboratorium biologi farmasi yang telah membantu selama penulis melakukan penelitian.
9. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang, yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan sebagai dasar penulisan skripsi ini.
10. Maftuhatul Ulya, Atika Syahara Putri dan Tito Yusyac Maulana yang selalu setia menemani penulis selama pengerjaan Skripsi dalam suka maupun duka.
11. Uus Musyarofah, Siti Mutmainah, Nunung Trisnaningrum, Wihdah Naila F, Naila In'amul, Thoharoh Fajriati dan Nurul Azizah dari kamar Ar-Rofi'u Ponpes Putri Luhur Wahid Hasyim Semarang yang selalu menampung keluhan maupun kebahagiaan, memberi motivasi serta memberi semangat dalam penyelesaian skripsi ini.
12. Terimakasih penulis sudah diberi kesempatan untuk mengenal, berteman dan belajar dari sahabat-sahabat baikku Uus Musyarofah, Afriyani, Uswatun Khasanah, Amalia Sekar, Missilfa Yulianti, Maelatul Afifah selama di tempat perantauan.

13. Teman-teman KKN Nongkosawit, terimakasih untuk kebersamaannya dan kesan walaupun dalam waktu yang singkat.
14. Teman-teman angkatan 2016 Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang, terimakasih dan semoga sukses untuk kita semua.
15. Serta semua pihak yang telah banyak memberikan bantuan yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Dalam proses penyusunan hingga terwujudnya skripsi ini, penulis banyak memperoleh dukungan, motivasi, perhatian, dan juga masukan. Penulis menyadari bahwa plaporan tugas akhir ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, saran dan kritik yang membangun dari pembaca akan menjadi masukan yang sangat berharga bagi penulis. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Semarang, 20 Februari 2020



Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
INTISARI.....	ii
<i>ABSTRACT</i>	iii
PENGESAHAN SKRIPSI	iv
SURAT PERNYATAAN.....	v
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
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
1. Daun Singkong.....	4
2. Senyawa Flavonoid.	7
3. Radikal Bebas.....	9
4. Ekstraksi	9
5. Fraksinasi	11
6. Antioksidan	11
7. Spektrofotometri UV-Vis.....	13
8. Metode ABTS	14
F. Landasan Teori.....	15
G. Hipotesis.....	17
BAB II METODE PENELITIAN	18
A. Bahan dan Alat yang Digunakan.....	18
1. Bahan.....	18
2. Alat.....	18
B. Jalannya Penelitian.....	19
1. Pengumpulan Bahan.....	19
2. Determinasi Tanaman	19
3. Pembuatan Serbuk Simplisia	19
4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Singkong	20
5. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Singkong.....	22
6. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS	23
7. Penetapan Kadar Flavonoid Total.....	26
8. Analisis Data	29
BAB III HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	30
A. Determinasi Tanaman	30

B. Pengumpulan Serbuk Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Singkong.....	30
C. Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong.....	31
D. Penentuan Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong	32
E. Penentuan Kadar Flavonoid Total Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong	41
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN	48
A. Kesimpulan	48
B. Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Tingkat Kekuatan Antioksidan	12
Tabel II.	Hasil Penentuan Operating Time ABTS.....	34
Tabel III.	Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong Dengan Metode ABTS.....	36
Tabel IV.	Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Rutin Dengan Metode ABTS	38
Tabel V.	Perbandingan IC_{50} Antara Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong Dan Rutin.....	39
Tabel VI.	Hasil Penentuan Operating Time Senyawa Kompleks $AlCl_3$ – Rutin	43
Tabel VII.	Hasil Penentuan Kurva Baku Rutin	44
Tabel VIII.	Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Manihot esculenta Crantz	5
Gambar 2.	Struktur Umum Flavonoid (1) , Isoflavonoid (2), dan Neoflavonoid (3)	8
Gambar 3.	Mekanisme Reaksi ABTS.....	14
Gambar 4.	Oksidasi ABTS Oleh Kalium Persulfat Untuk Menghasilkan Kation Radikal ABTS • + Dan Reaksinya Dengan Senyawa Antiradikal (AOH)	15
Gambar 5.	Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Singkong	21
Gambar 6.	Skema Jalannya Fraksinasi	22
Gambar 7.	Skema Jalannya Penelitian.....	27
Gambar 8.	Hasil Penentuan Panjang Gelombang ABTS.....	32
Gambar 9.	Oksidasi ABTS Oleh Kalium Persulfat Untuk Menghasilkan Kation Radikal ABTS • + Dan Reaksinya Dengan Senyawa Antiradikal (AOH)	35
Gambar 10.	Kurva Persamaan Regresi Linear % Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Singkong Replikasi 1	37
Gambar 11.	Kurva Persamaan Regresi Linear Aktivitas Antioksidan Rutin Replikasi 3	38
Gambar 12.	Hasil Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Rutin.....	41
Gambar 13.	Kurva Baku Rutin Replikasi 3	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman Singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	54
Lampiran 2. Perhitungan Simplisia, Ekstrak, dan Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong	57
Lampiran 3. ABTS (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid)	59
Lampiran 4. Perhitungan ABTS 7,33 mM dan $K_2S_2O_8$ 2,45mM.....	60
Lampiran 5. Pembuatan Larutan Induk Rutin	62
Lampiran 6. Pembuatan Larutan Stok Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong	64
Lampiran 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (ABTS)	66
Lampiran 8. Penentuan Operating Time (ABTS)	67
Lampiran 9. Data Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	68
Lampiran10.Hasil Analisa Reresi linear Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Singkong	70
Lampiran 11. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum(Flavonoid).....	71
Lampiran 12. Penentuan Operating Time (Flavonoid)	72
Lampiran 13.Penentuan Kurva Baku Rutin	73
Lampiran 14. Perhitungan Kadar Flavonoid Total Fraksi Air Ekstrak etanol Daun Singkong	76
Lampiran 15. Dokumentasi.....	78
Lampiran 16. Surat Keterangan Telah Menyelesaikan Penelitian	81

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Fenomena radikal bebas yang disebabkan pemanasan global oleh sinar matahari dapat memberi dampak buruk bagi kesehatan. Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada disekitarnya. Radikal bebas dapat dihasilkan melalui 2 cara yaitu secara endogen (reaksi biokimiawi intrasel maupun ekstrasel) dan secara eksogen (polusi, makanan ataupun absorpsi melalui kulit). Keadaan di atas dapat menyebabkan kerusakan sel dan gangguan fungsi sel yang dapat memicu munculnya berbagai penyakit seperti penyakit degeneratif, penyakit autoimun hingga kanker. Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktivitas antioksidan dalam tubuh, sehingga diperlukan antioksidan alami dari luar tubuh (Winarsi, 2007).

Antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi radikal bebas dalam tubuh (Prakash dkk., 2006). Salah satu sumber antioksidan alami untuk mencegah radikal bebas yaitu daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Daun singkong diketahui memiliki kandungan senyawa aktif flavonoid dan fenolik (Faezah dkk., 2013). Flavonoid merupakan senyawa polifenol tanaman yang tersebar luas dalam berbagai bahan makanan dan dalam berbagai konsentrasi sebagai antioksidan (Winarsi, 2007). Oleh karena itu, dalam

penelitian ini akan mengkaji daun singkong untuk mengetahui kadar flavonoid total sebagai antioksidan alami yang dapat mencegah radikal bebas.

Penelitian daun singkong sebelumnya pernah dilakukan oleh Hasim dkk. (2016) yang menyebutkan bahwa daun singkong diketahui mengandung senyawa kelompok fenolik khususnya flavonoid yang merupakan salah satu antioksidan alami. Analisis komponen fitokimia ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menunjukkan ekstrak air dan ekstrak metanol daun singkong mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, fenolik, dan saponin.

Hal ini juga diperkuat dengan hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan bahwa ekstrak daun singkong mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar $4,6170 \pm 0,2570$ mg/mL. Nilai ini menunjukkan konsentrasi ekstrak daun singkong yang diperlukan untuk menghilangkan 50% aktivitas DPPH (Puspitarini, 2010). Daun singkong banyak mengandung senyawa murni dari jenis flavonoid seperti rutin dan kuersetin (Tsumbu dkk., 2011).

Metode yang digunakan yaitu metode ABTS karena pengujian ABTS 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 senyawa antioksidan untuk menstabilkan senyawa radikal bebas dengan mendonorkan radikal proton (Fitriana dkk., 2015). Berdasarkan penelitian Indria (2018)

menyatakan bahwa fraksi air ekstrak etanol daun kelor menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar 168,44 $\mu\text{g/ml}$ maka tergolong antioksidan yang lemah dan hasil penetapan kadar flavonoid total fraksi air ekstrak etanol diperoleh sebesar 5,17 g/QE/g.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka diketahui bahwa penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid total pada fraksi air ekstrak etanol daun singkong dengan metode ABTS (*2,2-Azinobis 3-ethyl benzothiazoline 6sulfonic acid*) belum pernah dilakukan sebelumnya dan penelitian ini merupakan pengembangan pengujian aktivitas antioksidan yang sebelumnya sudah di uji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.

B. Rumusan Masalah

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

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

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan :

1. Mengetahui apakah fraksi air ekstrak etanol daun singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ABTS yang dinyatakan dengan IC₅₀.
3. Mengetahui kadar flavonoid total pada fraksi air ekstrak etanol daun singkong (*Manihot Esculenta* Crantz).

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat yaitu memberikan informasi ilmiah mengenai fraksi air ekstrak etanol daun singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) yang memiliki aktivitas antioksidan alami dan menambah ilmu pengetahuan tentang antioksidan dalam bidang kesehatan serta referensi bagi penelitian selanjutnya.

E. Tinjauan Pustaka

1. Daun Singkong

a. Klasifikasi

Manihot esculenta Crantz adalah semak kayu dari keluarga *Euphorbiaceae*, yang berasal dari Amerika Selatan, secara luas dibudidayakan sebagai tanaman tahunan di daerah tropis dan subtropis untuk tanaman tepung & akar umbinya yang dapat dimakan yang merupakan sumber karbohidrat utama (Bahekar dan

Kale., 2013). Klasifikasi daun singkong berdasarkan hasil determinasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>Manihot esculenta</i> Crantz (Backer dkk., 1963 dan Steenis, 1981).

b. Morfologi



Gambar 1. *Manihot esculenta* Crantz (dokumentasi probadi)

Sinonimnya yaitu *Cassava*, *manioc*, *yuca*, *tapioca*, *mandioca*, *shushu*, *muk shue*, *cassave*, *maniok*, *tapioka*, *imanoka*, *maniba*, *kasaba*, *katela boodin*, *sweet potato tree*, *Brazilian arrowroot*. Tanaman ini adalah semak atau pohon semi-kayu setengah tahunan yang tinggi, yang dapat tumbuh hingga setinggi 7 m, memiliki batang tunggal hingga bercabang. Kulit kayu luar berwarna halus, berwarna coklat muda hingga abu-abu kekuningan sementara kulit kayu bagian

dalam adalah berwarna krem-hijau dan dalam konsistensi kayu lunak (Bahekar dan Kale, 2013).

Daun memiliki klasifikasi yaitu tangkai daun kehijauan menjadi merah. Daun berwarna hijau tua di atas dan pucat kehijauan di bawahnya, kadang beranekaragam dan gagang bunga berwarna hijau muda sampai merah. Buah agak bulat, hijau (hingga kuning muda, putih, coklat tua), halus, dan dengan sayap memanjang (Bahekar dan Kale, 2013).

Akar daun singkong tumbuh dalam kelompok 4-8 di pangkal batang. Akar berdiameter 1-4 inci dan panjang 8-15 inci. Interior putih murni lebih kencang dari kentang dan mengandung konten pati tinggi. Akar ditutupi dengan kulit berserat coklat kemerahan tipis yang dihilangkan dengan cara dikikis dan dikupas. Batang tunggal hingga beberapa batang, batang berwarna hijau muda sampai kemerahan, node kemerahan. Kulit luarnya halus, coklat muda ke abu-abu kekuningan & kulit bagian dalam berwarna krem-hijau (Bahekar dan Kale, 2013).

c. Kandungan Senyawa

Daun singkong diketahui mengandung senyawa kelompok fenolik khususnya flavonoid yang merupakan salah satu antioksidan alami (Hasim dkk., 2016). Tanaman yang termasuk famili Euphorbiaceae ini kaya kandungan kimia seperti hidrat arang, kalsium, fosfor, lemak, protein, vitamin A, vitamin B1, vitamin C, zat besi (daun), enzim peroksidase, glikosida, kalsium, protein, kalsium oksalat, tanin (kulit batang) dan vitamin C (umbi) (Hariana, 2015).

d. Khasiat

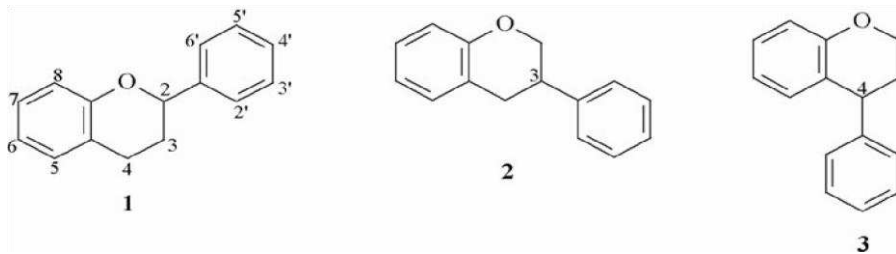
Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) diketahui mengandung senyawa kelompok fenolik khususnya flavonoid yang merupakan salah satu antioksidan alami. Selain berperan sebagai antioksidan daun singkong juga dapat dijadikan sebagai obat tradisional yaitu dapat digunakan masyarakat untuk mengobati penyakit beri-beri, rematik dan penglihatan kurang jelas (Hariana, 2015).

2. Senyawa Flavonoid

Flavonoid adalah sekelompok besar senyawa polifenol yang tersebar luas dalam berbagai tanaman. Flavonoid mempunyai sejumlah gugus hidroksil sehingga bersifat polar. Flavonoid dapat larut dalam pelarut yang bersifat polar seperti air, etanol, metanol, butanol dan aseton. Adanya gula yang terikat dalam flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dengan demikian pelarut air merupakan pelarut yang lebih baik untuk flavonoid jenis glikosida (Markham, 1998).

Istilah "flavonoid" umumnya digunakan untuk menggambarkan koleksi luas produk alami yang mencakup kerangka karbon C₆-C₃-C₆, atau lebih khusus fungsi fenilbenzopiran. Bergantung pada posisi hubungan cincin aromatik dengan bagian benzopyrano (chromano), kelompok produk alami ini dapat dibagi menjadi tiga kelas: flavonoid (2-phenylbenzopyrans) 1, isoflavonoid (3-benzopyrans) 2, dan neoflavonoids (4-benzopyrans)³ (Marais dkk, 2006). Berdasarkan posisi

hubungan cincin aromatik dengan bagian benzopyrano dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 . Struktur umum flavonoid (1), isoflavonoid (2), dan neoflavonoid (3) (Marais dkk, 2006).

Sebagai antioksidan, flavonoid dapat menghambat penggumpalan keping-keping sel darah, merangsang produksi nitrit oksida yang dapat melebarkan (relaksasi) pembuluh darah, dan juga menghambat pertumbuhan sel kanker. Sifat antiradikal flavonoid terutama terhadap radikal hidroksil, anion superoksida, radikal peroksi dan alkoksil. Senyawa flavonoid ini memiliki afinitas yang sangat kuat terhadap ion Fe (Fe diketahui dapat mengkatalisis beberapa proses yang menyebabkan terbentuknya radikal bebas) (Winarsi, 2007).

Rutin bersifat antioksidan dimana senyawa ini dapat mencegah serangan lipid membran. Rutin menunjukkan kerjanya sebagai inhibitor peroksidasi lipid yang bergantung pada Fe, karena senyawa ini dapat membentuk kompleks inert bersama Fe. Senyawa flavonoid bekerja dengan cara mengkhelat logam, serta menangkap/menghentikan aktivitas radikal bebas. Hal ini terjadi interaksi rutin dengan ion superoksida. Rutin lebih efektif menghambat sistem peroksidasi lipid yang tergantung pada ion Fe. Pengkhelatan ion Fe menyebabkan kompleks ion inert dan tidak dapat mengawali terjadinya peroksidasi lipid sehingga aktivitas radikal bebas kompleks ion flavonoid dapat dihentikan (Winarsi, 2007).

3. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada disekitarnya. Jika elektron yang terikat oleh senyawa radikal bebas tersebut bersifat ionik, dampak yang timbul memang tidak begitu berbahaya. Bila ion yang terikat radikal bebas dari senyawa yang berikatan kovalen, akan sangat berbahaya karena ikatan digunakan secara bersama-sama pada orbit terluarnya (Winarsi, 2007).

Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari pasangan elektron. Sebagai dampak kerja radikal bebas tersebut, akan terbentuk radikal bebas baru yang berasal dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal sebelumnya. Apabila dua radikal senyawa bertemu, elektron-elektron yang tidak berpasangan dari kedua senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil. Radikal bebas dapat terbentuk melalui 2 cara, yaitu secara endogen (sebagai respon normal proses biokimiawi intrasel maupun ekstrasel) dan secara eksogen (polusi, makanan serta injeksi ataupun absorpsi melalui kulit) (Winarsi, 2007).

4. Ekstraksi

Beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan untuk memperoleh ekstrak komponen suatu sampel, yaitu metode maserasi, refluks, dan soxhlet. Ekstrak

adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995).

Maserasi (*macerase* = mengairi, melunakkan) adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat farmakope disatukan dengan bahan pengekstraksi. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindungi dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan dikocok kembali. Waktu lamanya maserasi berbeda-beda masing-masing farmakope mencantumkan 4-10 hari (Voigt, 1994).

Setelah selesai waktu maserasi, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk kedalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Voigt, 1994).

Prinsip dari ekstraksi maserasi adalah penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk dalam cairan penyari yang sesuai selama sehari atau beberapa hari, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi) (Ansel, 1989). Keuntungan dari metode ini ialah peralatannya yang sederhana, sedang kerugiannya antara lain waktu yang diperlukan untuk mengekstrak sampel cukup

lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, tidak dapat digunakan untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin, tiraks, dan lilin (Simanjuntak, 2008).

5. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan metode pemisahan komponen campuran yang berasal dari ekstrak hasil ekstraksi. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lainnya berdasarkan perbedaan kepolaran. Metode fraksinasi yang biasa digunakan adalah dengan ekstraksi cair-cair dan kromatografi. Proses fraksinasi ekstrak secara ekstraksi cair-cair dilakukan berdasarkan perbedaan kelarutan atau koefisien partisi senyawa diantara dua pelarut yang saling tidak bercampur (Harborne, 1987).

6. Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menunda, memperlambat atau mencegah terjadinya proses oksidasi lipida. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi autooksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipida (Prakash dkk., 2006).

Antioksidan dikelompokkan menjadi 2 yaitu antioksidan enzimatis (enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathione peroksidase) dan non-enzimatis masih dikelompokkan menjadi dua yaitu antioksidan larut lemak (tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin) dan antioksidan larut air (asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam dan protein pengikat heme).

Antioksidan enzimatis dan non-enzimatis bekerjasama memerangi aktivitas senyawa oksida dalam tubuh (Winarsi, 2007).

Antioksidan yang diproduksi oleh tubuh terdiri atas tiga enzim yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksida (GSH Px), katalase serta nonenzim yaitu senyawa protein kecil glutathion. SOD berperan dalam melawan radikal bebas pada mitokondria, sitoplasma dan bakteri aerob dengan mengurangi bentuk radikal bebas superoksida. Antioksidan glutathion peroksida bekerja dengan cara menggerakkan H_2O_2 dan lipid peroksida dibantu dengan ion logam-logam transisi (Murray, 2003).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier. Secara fisiologis terdapat 2 sistem pertahanan tubuh dari antioksidan yaitu:

- a. Sistem pertahanan preventif dengan cara pembentukan senyawa oksigen reaktif dihambat cara pengkelatan metal, atau jika sudah terbentuk senyawa itu dirusak.
- b. Sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal berantai, yang dilakukan oleh antioksidan primer (Winarsi, 2007).

Menurut Blois, (1958) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dapat diukur dari nilai IC_{50} yang dinyatakan pada Tabel 1.

Tabel 1. Tingkat kekuatan antioksidan (Blois, 1958).

Aktivitas antioksidan	Nilai IC_{50} (ppm)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	101-150
Lemah	>150

7. Spektrovotometri Uv-Vis

Spektrovotometri Uv-Vis adalah alat yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah Uv-Vis (Depkes RI, 1995). Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm - 380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm - 780 nm). Meskipun spektrum pada daerah ultraviolet dan daerah cahaya tampak dari suatu zat tidak khas, tetapi sangat cocok untuk penetapan kuantitatif, dan untuk beberapa zat berguna untuk membantu identifikasi. Daya serap atau serapan jenis zat pada batas-batas kadar tertentu adalah tetap, tidak tergantung dari intensitas radiasi, panjang jalan sinar dan kadar larutan sehingga spektrofotometri serap dapat digunakan penetapan kadar (Depkes RI, 1979).

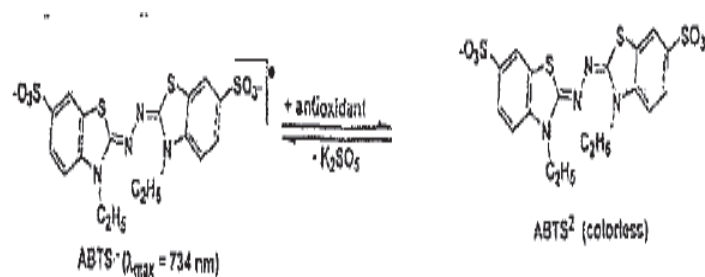
Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan. Dalam hukum Lambert-Beer tersebut ada beberapa pembatasan yaitu sinar yang digunakan dianggap monokromatis, penyerapan terjadi dalam suatu volume yang mempunyai penampang luas yang sama, senyawa yang menyerap dalam larutan tersebut tidak tergantung terhadap yang lain dalam larutan tersebut, tidak terjadi peristiwa fluoresensi atau fosforisensi dan indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan. Rumus Hukum Lambert-Beer yaitu $A = abc$

Keterangan: A = absorban
 a = absorptivitas
 b = tebal kuvet (cm)
 c = konsentrasi (Gandjar dan Rohman, 2007)

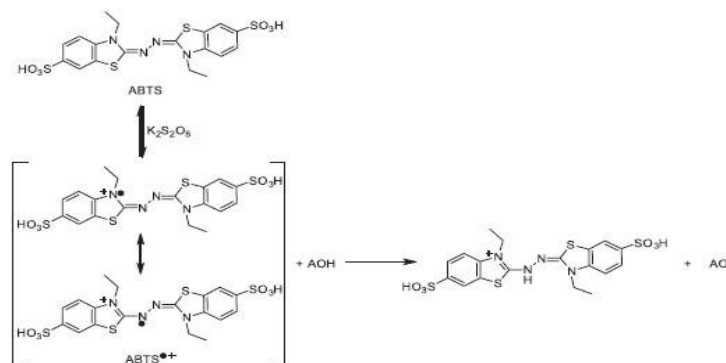
Spektrofotometer Uv-Vis digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut metanol atau etanol (Markham, 1998).

8. Metode ABTS

ABTS adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen yang mempunyai karakteristik warna biru-hijau, yang bila tereduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi bentuk non radikal dari berwarna menjadi tidak berwarna. Metode ABTS sangat sensitif terhadap cahaya, bahkan pembentukan ABTS memerlukan waktu inkubasi selama 12-16 jam dalam kondisi gelap. Prinsip pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS (Finna dkk., 2018). Mekanisme reaksi radikal ABTS dan oksidasi ABTS oleh kalium dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4.



Gambar 3. Mekanisme Reaksi Radikal ABTS (Huang dkk., 2005)



Gambar 4. Oksidasi ABTS oleh kalium persulfat untuk menghasilkan kation radikal ABTS $^{\bullet+}$ dan reaksinya dengan senyawa antiradikal (AOH) (Oliveira, 2006).

F. Landasan Teori

Radikal bebas dapat dihasilkan melalui 2 cara yaitu secara endogen (reaksi biokimiawi intrasel maupun ekstrasel) dan secara eksogen (polusi, makanan ataupun absorpsi melalui kulit). Paparan radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dan gangguan fungsi sel yang dapat memicu munculnya berbagai penyakit seperti penyakit degeneratif, penyakit autoimun hingga kanker (Winarsi, 2007). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mencegah terjadinya radikal bebas. Salah satu sumber antioksidan alami adalah daun singkong.

Berdasarkan penelitian dari Hasim dkk., (2016) menyebutkan bahwa daun singkong diketahui mengandung senyawa kelompok fenolik khususnya flavonoid yang merupakan salah satu antioksidan alami. Analisis komponen fitokimia ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menunjukkan ekstrak metanol daun singkong mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, fenolik, dan saponin.

Berdasarkan hasil penelitian dari Tsumbu dkk., (2011) daun singkong banyak mengandung senyawa murni dari jenis flavonoid seperti rutin dan kuersetin. Senyawa rutin dalam daun singkong yang diperkirakan merupakan senyawa yang

berperan dalam penghambatan aktivitas radikal bebas. Rutin merupakan senyawa golongan flavonoid golongan glikosida yang menjadi kandungan *Manihotis Folium*. Rutin adalah senyawa flavonoid yang larut dalam etanol dan air. Berdasarkan hasil penelitian dari Sari (2010) menunjukkan bahwa komposisi etanol pelarut yang menghasilkan kadar rutin tertinggi adalah murni etanol 96% tanpa ditambah air, dengan rata-rata kadar rutin $5,9664\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 2.4718$.

Menurut penelitian Irianti dkk., (2015) menyatakan bahwa penyarian dengan etanol 96% untuk ekstrak etanol daun mengkudu yang difraksinasi menggunakan pelarut air memiliki kandungan flavonoid glikosida yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol daun mengkudu. Berdasarkan penelitian Verawati dkk. (2017) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dengan metode DPPH paling baik dihasilkan oleh ekstrak dari metode maserasi dibandingkan dengan metode perkolasi dan sokhletasi dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $35,05\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $49,67\ \mu\text{g}/\text{ml}$ dan $49,98\ \mu\text{g}/\text{ml}$.

Metode yang digunakan yaitu metode ABTS karena pengujian ABTS 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. (Fitriana dkk., 2015). Berdasarkan penelitian Indria (2018) menyatakan bahwa fraksi air ekstrak etanol daun kelor menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar $168,44\ \mu\text{g}/\text{ml}$ maka tergolong antioksidan yang lemah dan hasil penetapan kadar flavonoid total fraksi air ekstrak etanol diperoleh sebesar $5,17\ \text{g}/\text{QE}/\text{g}$.

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori tersebut, maka dapat diperoleh hipotesis yaitu:

- a. Fraksi air ekstrak etanol daun singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antioksidan.
- b. Fraksi air ekstrak etanol daun singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) memiliki kandungan flavonoid.

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, Semarang Jawa Tengah. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 96% teknis (Merck). Bahan yang digunakan untuk fraksinasi adalah aquadest dan etil asetat teknis (Merck). Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah ABTS (2,2 Azinobis (3-ethylbenothiazoline) 6-Sulfonic Acid) (Merck), rutin, dan kalium persulfat $K_2S_2O_8$, metanol p.a (Merck), aquadest dan etanol p.a (Merck). Bahan yang digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total adalah metanol p.a (Merck), rutin, pereaksi $AlCl_3$ 10% (Merck), kalium asetat (CH_3COOK), dan etanol 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

Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang digunakan pada penelitian ini berupa bagian daun singkong berwarna hijau yang muda dan segar, yaitu dari ujung batang yang masih muda. Menurut penelitian Solikhah dkk., (2019) menyatakan bahwa sampel daun singkong yang digunakan yaitu daun singkong yang terletak pada posisi ketiga sampai tujuh dari pucuk tanaman.

2. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan untuk mengetahui identitas tumbuhan yang digunakan pada penelitian, yaitu tumbuhan singkong. Determinasi dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistematika, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro Semarang (Backer dkk., 1963 dan Steenis, 1981).

3. Pembuatan Serbuk Simplisia

Pembuatan serbuk daun singkong dari daun singkong yang dipetik langsung kemudian dilakukan sortasi dan pencucian dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel. Daun singkong ditimbang untuk mengetahui berat daun singkong, kemudian dilakukan pengovenan untuk menghilangkan sisa kadar air dengan suhu 50°C sampai kering dengan ciri-ciri daun singkong mudah hancur bila diremas dengan tangan. Simplisia yang sudah kering disortasi kering untuk memastikan tidak ada pengotor yang tidak diinginkan atau memisahkan bagian simplisia yang sudah rusak atau gosong akibat pengovenan. Simplisia kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan cara

diblender dan diayak dengan menggunakan penyerbuk elektrik untuk mendapatkan derajat halus yang sama (Hasim dkk., 2016).

Hasil serbuk yang diperoleh kemudian disaring dengan kertas saring. Persyaratan kadar air pada simplisia kering sebelum dilakukan proses penyarian yaitu kurang dari 10 %. Setelah diperoleh hasil kadar air, susut pengeringan serbuk simplisia dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

Serbuk yang diperoleh kemudian disimpan di tempat yang tidak terkena sinar matahari supaya tidak terjadi dekomposisi kandungan senyawa dan diberi silika gel agar dapat tahan lama (Depkes RI, 1985).

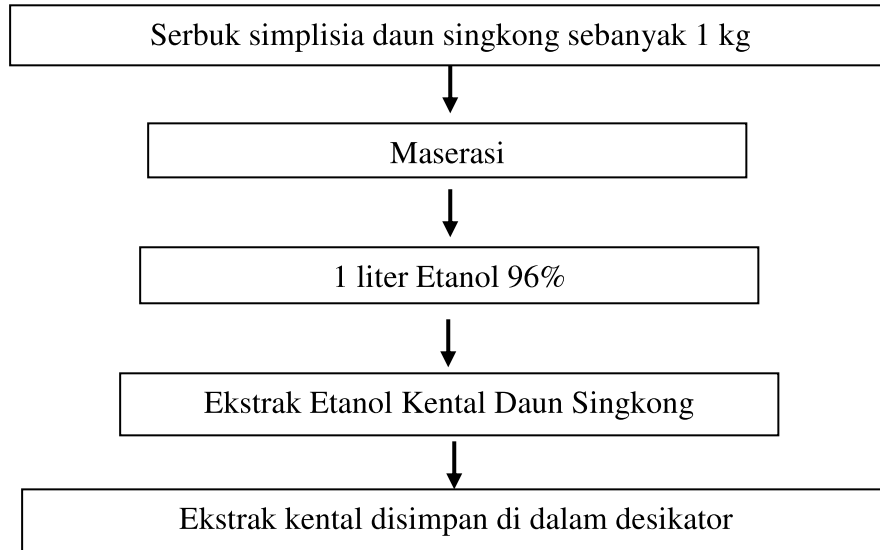
4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Singkong

Serbuk simplisia daun singkong sebanyak 1 kg diekstraksi menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia dimasukkan kedalam toples kaca yang bersih kemudian ditambah etanol 96% sebanyak 7500 ml sebagai cairan 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 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 maserat II.

Hasil maserat I dan maserast II dicampur, kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 60 rpm sampai tidak ada etanol yang menetes dan didapatkan ekstrak kental (Hasim dkk., 2016). Setelah diperoleh ekstrak kental daun singkong, randemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

Ekstrak yang didapatkan kemudian disimpan guna mempertahankan kualitas fisik dan kestabilan kandungan senyawa aktif sehingga tetap memenuhi persyaratan mutu (Depkes RI, 1985). Skema jalannya ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 5.

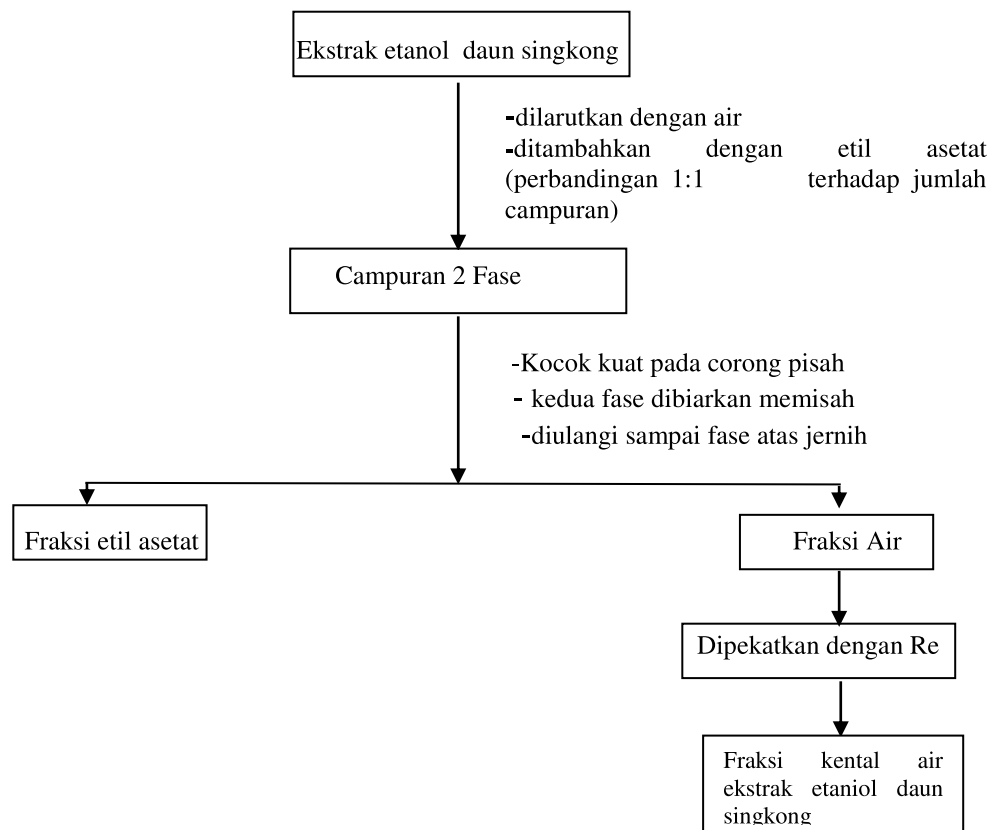


Gambar 5. Skema pembuatan Ekstrak Etanol Daun Singkong

5. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Singkong

Fraksinasi ekstrak etanol 96% daun singkong dilakukan secara partisi dengan menggunakan corong pisah yang bertujuan untuk memisahkan campuran komponen kimia yang terdapat dalam ekstrak menggunakan dua pelarut yang tidak bercampur. Komponen kimia yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan akan larut kedalam pelarut sesuai dengan tingkat kepolaran yang dimiliki oleh senyawa tersebut yaitu n-Heksan bersifat non polar, etil asetat bersifat semipolar dan air bersifat polar (Harborne, 1987).

Fraksinasi ekstrak etanol daun singkong dilakukan secara partisi menggunakan corong pisah. Ekstrak etanol daun singkong sebanyak 20 g dilarutkan dalam 200 mL air hingga larut sempurna. Kemudian ekstrak tersebut ditambahkan 200 mL etil asetat dalam corong pisah. Campuran digojog hingga terbentuk 2 lapisan dan dipisahkan fase-fase yang terbentuk. Sisa fase air ditambah 200 mL etil asetat dan digojog hingga terjadi pemisahan kembali. Dilakukan cara yang sama hingga fase dari air yang ditambahkan jernih (tidak ada zat yang tersari). Hasil fraksinasi air dikentalkan dengan *rotary evaporator*. Randemen ditimbang bobot ekstrak kentalnya dan dicatat sebagai bobot fraksi air ekstrak etanol daun singkong. Fraksi fraksi air ditentukan aktivitas antioksidannya dengan metode ABTS. Skema jalannya fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema jalannya 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 (400,4 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.

c. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Sampel

Fraksi air 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).

d. Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimal

Penentuan λ maksimal 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.

e. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *Operating Time* dilakukan dengan cara diambil larutan induk rutin 75 μ l kemudian ditambah ABTS 1 mL lalu dicukupkan volumenya sampai 5 ml 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 eranol p.a. dalam labu ukur. Larutan ini kemudian dibaca absorbansinya 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 400,4 ppm dipipet masing-masing 25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl dan 125 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) :

$$\text{Daya antioksidan} = \frac{(\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel})}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100 \%$$

2) Uji Aktivitas Antioksidan Daun Singkong

Larutan stok sampel fraksi air ekstrak etanol daun singkong 1002 ppm dipipet masing-masing 50 µl, 100 µl, 200 µl, 400 dan 250 µl, campuran ditambah 1 ml larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 10 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) :

$$\text{Daya antioksidan} = \frac{(\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel})}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100 \%$$

7. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Pembuatan Larutan Induk Rutin (400,4 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. Larutan tersebut ditambah dengan AlCl_3 dan kalium asetat kemudian 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. Larutan tersebut ditambah dengan AlCl_3 dan kalium asetat kemudian 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).

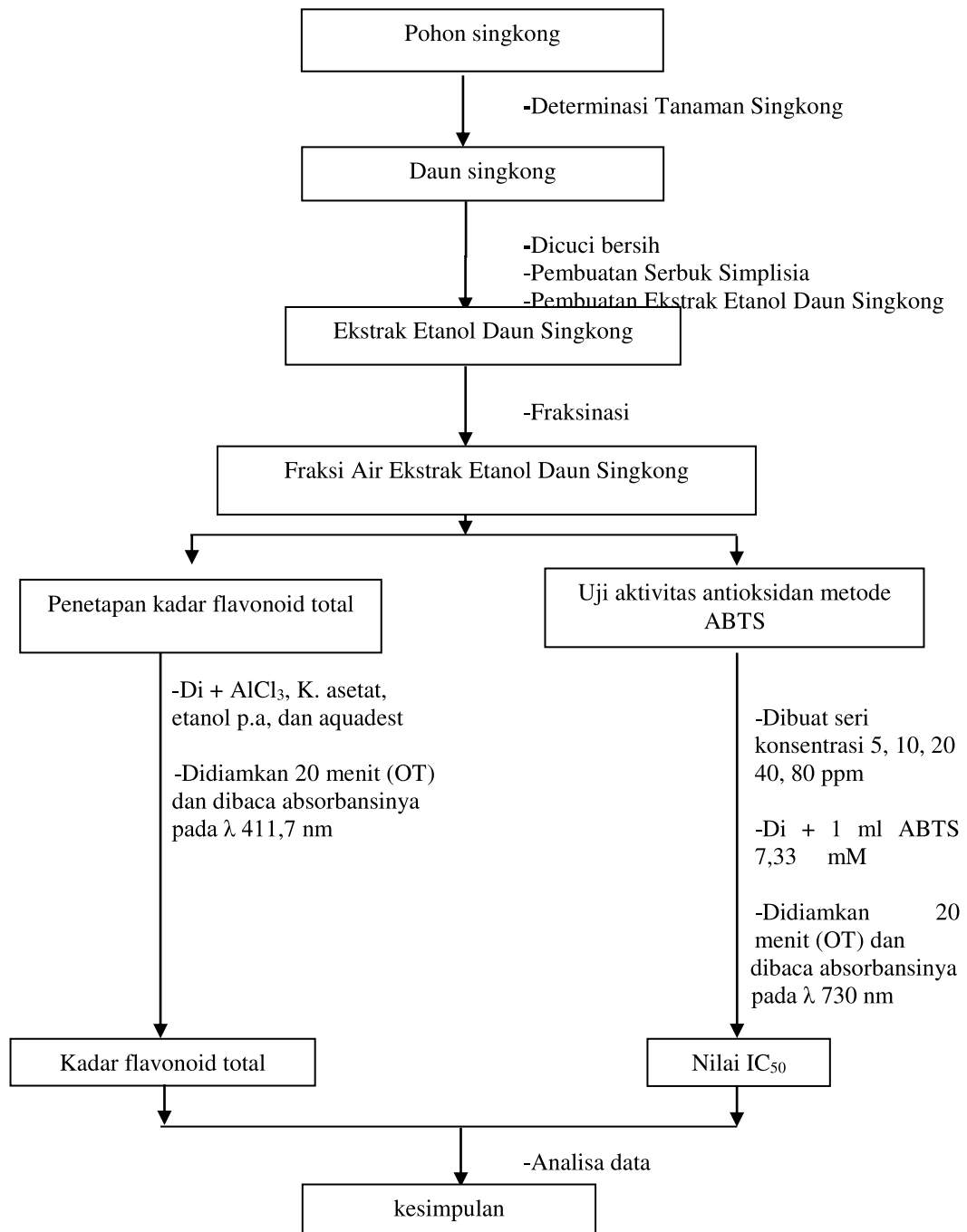
d. Pembuatan Kurva Baku Rutin

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 400,4 ppm sebanyak 25 mL 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 maksimal (Manik dkk., 2014).

e. Pengukuran Flavonoid Total

Analisis kuantitatif flavonoid total pada daun singkong dilakukan dengan metode spektrofotometri visibel menggunakan pereaksi alumunium klorida (AlCl_3). Larutan induk fraksi air ekstrak etanol daun singkong yang sudah diencerkan 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* kemudian diukur dengan spektrofotometer visibel pada lamda maksimal (Manik dkk., 2014).

Skema jalannya penelitian dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema jalannya penelitian

8. Analisis Data

a. Uji Aktivitas Antioksidan

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

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

Keterangan:

Abs blangko = absorbansi ABTS

Abs sampel = absorbansi fraksi air ekstrak etanol daun singkong

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

b. Penetapan Kadar Flavonoid Total

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

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{C \times V \times fp}{g}$$

Keterangan:

C = Kosentrasi Flavonoid (nilai X)

V = Volume fraksi yang digunakan (ml)

Fp = Faktor Pengenceran

G = Berat sampel yang digunakan (g)

HALAMAN INI TIDAK TERSEDIA

BAB III

**DAPAT DIAKSES MELALUI
UPT PERPUSTAKAAN UNWAHAS**

ekstrak etanol daun mengkudu yang difraksinasi menggunakan pelarut air memiliki kandungan flavonoid glikosida yang tinggi.

BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan :

1. Fraksi air ekstrak etanol 96 % daun singkong memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan metode ABTS, dengan nilai IC_{50} sebesar 62,31 $\mu\text{g/mL}$.
2. Fraksi air ekstrak etanol 96 % daun singkong memiliki kadar flavonoid total sebesar 39,62 mgRE/g.

B. Saran

Saran dari penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian tentang isolasi hasil fraksi air ekstrak etanol daun singkong mengandung senyawa flavonoid jenis glikosida

DAFTAR PUSTAKA

- Ansel. H.C., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah, Edisi Empat, UI Press, Jakarta.
- 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.
- Azizah, D.N., Kumolowati, E., dan Faramayuda, F., 2014, Penetapan Kadar Flavonoid Metode $AlCl_3$ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.), Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal, Purwokerto.
- Backer dkk., 1963 dan Steenis, 1981, Flora Of Java dan Flora, Sekolah Untuk Indonesia, Nedherland dan Jakarta.
- Bahekar dan Kale, 2013, *Phytopharmacological Aspects Of Manihot Esculenta Crantz (Cassava) - A Review*. Department of Pharmacology, Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences, Sewagram, Wardha.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant Determinations By The Use Of A Stable Free Radical, *Journal Nature* 181: 1199-1200.
- Departemen kesehatan RI., 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan*, Jilid I, Direktorat Jendral POM, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Departemen kesehatan RI, 1995. *Farmakope Indonesia Edisi VI. Direktorat Jendral Pengawasan Obat Dan Makanan*: Jakarta halaman7, 1221-1223.
- Departemen kesehatan RI, 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*, Jakarta: Depkes RI.
- Departemen keseshatan RI, 1979 *Farmakope Indonesia Edisi III*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Faezah, N., Aishah, S., dan Kalsom, U., 2013, *Comparative evaluation of organic and inorganic fertilizers on total phenolic, total flavonoid, antioxidant activity and cyanogenic glycosides in cassava (Manihot esculenta)*. Department of Biological Science, Universiti Putra Malaysia, 43400 Serdang, Selangor, Malaysia.
- Finna, S., Yunita, O., dan Kurniawan, A., 2018, *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (Caesalpinia sappan) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP*. Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Surabaya.

- Fitriana, D.W., Fatmawati, S., dan Ersam, T., 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) 8 dan 9 Juni 2015, Bandung, Indonesia.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, Kimia Farmasi Analisis, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 253-254, 353-360.
- Haeria, Hermawati, Dan Andi, T.U., 2016, Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.), Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Alauddin Makassar, Makassar.
- Harborne, J.B, 1987, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwan Sudiro, Cetakan Kedua, Institute Teknologi Bandung.
- Hariana, Arief., 2015, Tumbuhan Obat & Khasiatnya, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hasim., Falah, S., Dewi, L.K., 2016, *Effect of Boiled Cassava Leaves (Manihot esculenta Crantz) on Total aPhenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity*. Department of Biochemistry. Bogor Agricultural University, Bogor.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L., 2005, *The chemistry behind antioxidant capacity assays. Reviews. J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.
- Indria, Fitri., 2018, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera* L.) Dengan Metode Dpph (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*) Serta Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya, Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
- Irianti, T., Puspitasari, A., Machwiyyah dan Rabbani., 2015, Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Etanolik Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan Batang Brotowali (*Tinospora crispa* L.), Fraksi Air Serta Fraksi Air Terhidrolisis, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- 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.
- Malik, A., Edward, F., Waris, R., Skrining Fitokimia dan Penetapan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Metanolik Herba Boroco (*Celosia argentea* L.), *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol 1 No.1.

- Manik, D.F., Hertiana, T. dan Anshory, H., 2014, Analisis 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.
- Marais, J.P., Deavours, B., Dixon, R.A., Dan Ferreira, D., 2006, The Science of Flavonoids, Springer ScienceBusiness Media, Inc.
- Markham, 1998. Cara Mengidentifikasi Flavonoid, diterjemahkan oleh Koasasih Padmawinata, Institute Teknologi Bandung.
- Murray, 2003. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- 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.
- Prakash A., Rigelhof F., & Miller. Antioxidant Activity. Medalion Laboratories. Analytical Progress. www.medallionlabs.com. Diakses pada tanggal 3 Oktober 2019.
- Puspitarini, 2010, *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Singkong (Manihot Folium) Menggunakan Metode Diphenylprycil Hidrazyl DPPH*. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Darma. Yogyakarta.
- 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 Didaerah Gorontalo, *Jurnal Kimia Fakultas Matematika Dan IPA, Universitas Negeri Gorontalo*, Gorontalo.
- Sari, V.Y.C., 2010. Optimasi Komposisi Etanol Dan Air dalam Proses Maserasi Daun Singkong (*Manihot Folium*) dengan Aplikasi Simplex Lattice Design, 44, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Simanjuntak, 2008. *Ekstraksi Dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Daun Tumbuhan Senduduk (Melastoma Malabathricum .L) Serta Pengujian Efek Sediaan Krim Terhadap Penyembuhan Luka Bakar*. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatera Utara. Medan.

- 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.
- Solikhah, R., Purwantoyo, E., dan Rudyatmi, E., 2019, Aktivitas Antioksidan dan Kadar Klorofil Kultivar Singkong Di Daerah Wonosobo, Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang, Semarang.
- Tsumbu, C.N., Dupont, G.D., Tits, M., 2011, *Antioxidant 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*. Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Interfaculty Centre of Drug Research (CIRM), Faculty of Medicine.
- Verawati., Nofiandi, D., dan Petmawati., 2017, Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Fenolat Total Dan Aktivitas Antioksidan Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.), STIFI Perintis , Padang.
- Voigt, R., 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi ke-5*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Wahyulianingsih, Handayani, S., dan Malik A., 2016, Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry), *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*.
- Winarsi, H, 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Yogyakarta : Kanisius.