

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

SKRIPSI



Oleh :

Tito Yusyac Maulana

165010047

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

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN
SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz) MENGGUNAKAN
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**

Semarang

Oleh :

Tito Yusyac Maulana

165010047

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

INTISARI

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

Penyakit degeneratif, gangguan fungsi sel, dan kerusakan struktur sel akibat adanya radikal bebas didalam tubuh, radikal bebas terbentuk dari berbagai faktor salah satunya yaitu polusi lingkungan. Radikal bebas dapat dihambat dengan antioksidan salah satunya yaitu flavonoid. Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mengandung senyawa flavonoid sehingga berpotensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan metode ABTS dan penetapan kadar flavonoid totalnya.

Daun singkong diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sehingga dihasilkan ekstrak etanol daun singkong. Ekstrak etanol daun singkong dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS dilakukan menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum 730 nm dengan *operating time* selama 20 menit untuk memperoleh nilai IC_{50} , senyawa rutin digunakan sebagai kontrol positif. Penetapan kadar flavonoid total dengan metode spektrofotometri UV-Vis, menggunakan pereaksi $AlCl_3$ dan standar rutin yang hasilnya dinyatakan dalam ekuivalen rutin (mg RE/g sampel). Analisis data menggunakan regresi linier.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun singkong memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 69,8675 dan ekstrak etanol daun singkong memiliki kadar flavonoid total sebesar 29,466 mgRE/g sampel. Maka ekstrak etanol daun singkong memiliki aktivitas antioksidan dan memiliki kandungan flavonoid total.

Kata kunci: antioksidan, ABTS, daun singkong, *Manihot esculenta* Crantz, flavonoid total.

ABSTRACT

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

*Degenerative diseases, impaired cell function, and damage to cell structure due to free radicals in the body, free radicals form environmental pollution. Free radicals can be inhibited by antioxidant, that is flavonoid. Cassava leaves contain flavonoid and have potential antioxidant. This study aims to determine the antioxidant activity of ethanol extract of Cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) use the ABTS method and determination of total flavonoid levels.*

Cassava leaves are extract by maceration using ethanol 96% solvent produced ethanol extract of cassava leaves. The ethanol extract of cassava leaves was tested for antioxidant activity by ABTS method carried out using a visible spectrophotometer at a maximum wavelength of 730 nm with an operating time of 20 minutes to obtain an IC50 value, routine can be used for positive control. Determination of total flavonoid levels by UV-Vis spectrophotometry method, using AlCl₃ reagents and routine standards obtained in routine equivalents. Analysis with linier regression.

The results showed that cassava leaf ethanol extract had antioxidant activity with IC50 values of 69.8675 ppm including strong antioxidants and ethanol extract of cassava leaves had total flavonoid levels of 29.466 mgRE/g sample. So the ethanol extract of cassava leaves has antioxidant activity and total flavonoid content.

*Keywords: antioxidants, ABTS, cassava leaves, *Manihot esculenta* Crantz, total flavonoids.*

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

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

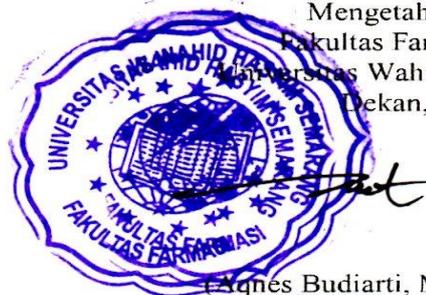
oleh:
Tito Yusyac Maulana
165010047

**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,

(Annes Budiarti, M.Sc., Apt.)

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tito Yusyac Maulana

NIM : 165010047

Judul Skripsi : Aktivitas Antioksidan 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 saya buat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 5 Maret 2020



Tito Yusyac Maulana

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

Awali dengan niat lalu kerjakan semua yang sudah menjadi
tujuan hidup

Menjadi manusia berbudi pekerti luhur yang tau benar dan
salah serta bertaqwa kepada TUHAN YANG MAHA ESA

Ojo seneng gawe susah ing liyan opo alane gawe seneng
ing liyan

LOSHT GAK REWEL

Kupersembahkan karya ini dengan penuh rasa cinta teruntuk :

- *Orang tuaku tercinta, Bapak Purwoto dan Ibu Titi Dwiyanti atas segala doa dan perjuangannya.*
- *Segenap keluarga besarku tercinta.*
- *Para Dosesn Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah membimbing dan mendidikku.*

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 “Aktivitas Antioksidan 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.

Penulis menyadari kelemahan serta keterbatasan yang ada sehingga dalam menyelesaikan skripsi ini memperoleh bantuan dari berbagai pihak, dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Aqnes Budiarti, M.Sc., Apt., selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.
2. 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.
3. Ibu Aqnes Budiarti, M.Sc., Apt., selaku dosen penguji yang telah memberikan koreksi, saran serta masukan kepada penulis.
4. Ibu Maria ulfah, M.Sc., Apt., selaku dosen penguji yang telah memberikan koreksi, saran serta masukan kepada penulis.
5. Pimpinan dan staf Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah mengizinkan dan membantu pelaksanaan penelitian ini.

6. Pimpinan dan staf Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah mengizinkan dan membantu pelaksanaan penelitian ini.
7. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang, yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan sebagai dasar penulisan skripsi ini.
8. Rika Rahmawati yang selalu dan menjadi tempat untuk berbagi suka dan duka, mendoakan, memotivasi, dan tak pernah lelah memberi semangat sehingga skripsi ini terselesaikan.
9. Teman-teman kelompok penelitian Atika Syahara P., Serli Adi A., Maftuhatul Ulya yang sudah mau berjuang bersama sampai akhirnya bisa menyelesaikan skripsi ini bersama.
10. Teman-teman angkatan 2016 Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang, terimakasih dan semoga sukses untuk kita semua.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang turut membantu penulis hingga terselesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan baik isi maupun susunannya. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat tidak hanya bagi penulis juga bagi para pembaca.

Semarang, 7 Maret 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
INTISARI.....	ii
<i>ABSTRACT</i>	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
SURAT PERNYATAAN.....	v
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	4
E. Tinjauan Pustaka.....	4
1. Daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	4
2. Khasiat dan kandungan kimia	5
3. Flavonoid.....	6

4. Rutin	7
5. Maserasi.....	8
6. Aktivitas antioksidan.....	9
7. Metode ABTS.....	10
8. Spektrofotometri UV-Vis	11
F. Landasan Teori	14
G. Hipotesis	15
BAB II. METODE PENELITIAN	16
A. Bahan dan Alat yang digunakan.....	16
1. Bahan	16
2. Alat	16
B. Jalannya Penelitian	17
1. Pengumpulan bahan	17
2. Determinasi tanaman.....	17
3. Pembuatan serbuk simplisia	17
4. Pembuatan ekstrak etanol daun singkong	18
5. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS	19
6. Penetapan kadar flavonoid total	21
C. Skema Jalannya Penelitian	23
D. Analisis Data.....	24
BAB III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	25
A. Determinasi Tanaman.....	25
B. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Singkong.....	25

C. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Singkong	26
D. Penetapan Kadar Flavonoid Total	34
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN	42
A. Kesimpulan.....	42
B. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	47

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Hasil penentuan <i>operating time</i> ABTS	28
Tabel II.	Hasil pengukuran aktivitas antioksidan rutin dengan metode ABTS.....	31
Tabel III.	Hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun singkong dengan metode ABTS.....	32
Tabel IV.	Hasil penentuan <i>operating time</i> senyawa kompleks rutin- AlCl_3	36
Tabel V.	Hasil penentuan kurva baku rutin	38
Tabel VI.	Hasil penetapan kadar flavonoid total	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun singkong.....	4
Gambar 2. Struktur umum flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid (Suhartono, 2016).....	6
Gambar 3. Struktur kuersetin-3- rutinosida (Harborne, 1987).....	7
Gambar 4. Reaksi pembentukan radikal bebas dari ABTS dengan kalium persulfat menjadi $ABTS^+$ dan reaksi pemerangkapan radikal bebas oleh antioksidan menjadi ABTS stabil kembali (Sami dan Rahimah, 2016).	11
Gambar 5. Skema jalannya penelitian.....	23
Gambar 6. Hasil ekstrak kental etanol daun singkong	26
Gambar 7. Hasil penentuan panjang gelombang ABTS	27
Gambar 8. Oksidasi ABTS oleh kalium persulfat untuk menghasilkan kation radikal $ABTS^+$ dan reaksinya dengan senyawa antiradikal (AOH) (Oliveira, 2006).....	30
Gambar 9. Kurva persamaan regresi linier aktivitas antioksidan rutin replikasi 1	31
Gambar 10. Kurva persamaan regresi linier % aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun singkong replikasi 3	32
Gambar 11. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum rutin	35
Gambar 12. Kurva baku rutin replikasi 3.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	48
Lampiran 2. ABTS (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid)	51
Lampiran 3. Perhitungan susut penguapan dan rendemen ekstrak	52
Lampiran 4. Perhitungan pembuatan larutan stok.....	53
Lampiran 5. Pembuatan seri konsentrasi	55
Lampiran 6. % Aktivitas antioksidan.....	57
Lampiran 7. Perhitungan IC ₅₀	60
Lampiran 8. Hasil perhitungan aktivitas antioksidan.....	61
Lampiran 9. Hasil uji kadar flavonoid total	62
Lampiran 10. Hasil spektrofotometri UV-Vis uji aktivitas antioksidan	63
Lampiran 11. Hasil Spektrofotometri UV-Vis uji kadar flavonoid total	69
Lampiran 12. Dokumentasi.....	75
Lampiran 13. Surat keterangan telah menyelesaikan penelitian	80

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Radikal bebas atau yang disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang akan menyerang molekul lain disekitarnya sehingga menyebabkan reaksi berantai terjadi dan menghasilkan radikal bebas yang beragam, seperti anion superoksida (O_2^-), hidroksi bebas (OH), alkoksil (RO^-), dan peroksil (ROO^-) (Suhartono, 2016). Berbagai kemungkinan dapat terjadi sebagai akibat kerja radikal bebas, termasuk gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, hingga penyakit degeneratif . Senyawa radikal bebas dalam tubuh bisa terbentuk secara terus menerus bisa melalui proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, bisa juga akibat respon terhadap pengaruh luar tubuh seperti polusi lingkungan, ultraviolet, asap rokok dan lain-lain. Radikal bebas dapat dihambat menggunakan antioksidan, senyawa flavonoid telah terbukti digunakan sebagai antioksidan dengan cara menghambat mencegah terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) atau menangkap ROS secara langsung (Winarsi, 2007).

Sumber antioksidan dapat diperoleh dari bahan alami misalnya daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Komponen fitokimia daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, fenolik, dan saponin. Ekstrak daun singkong memiliki aktivitas antioksidan yang di uji menggunakan metode DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 92,10 ppm (Hasim dkk., 2016).

Pengujian antioksidan dengan metode ABTS bisa dilakukan karena metode ini memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH dan dapat dipakai untuk menganalisa antioksidan. 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 menyetabilkan senyawa radikal bebas dengan mendonorkan radikal proton. (Fitriana dkk., 2015). Menurut penelitian dari Shirwaikar dkk. (2004) membandingkan pengujian aktivitas antioksidan antara metode ABTS dan DPPH pada ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) hasilnya yaitu metode ABTS memiliki nilai IC_{50} sebesar 40 ppm termasuk antioksidan sangat kuat, sedangkan pada metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar 110 ppm termasuk antioksidan lemah.

Ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi, menurut penelitian dari Verawati dkk. (2017) yaitu membandingkan metode ekstraksi yaitu maserasi, perkolasi dan sokhletasi pada daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). Hasil perbandingan tersebut yaitu metode maserasi menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih baik yaitu dengan nilai IC_{50} 35,057 $\mu\text{g/mL}$ walau tidak jauh beda dengan metode perkolasi yaitu 49,673 $\mu\text{g/mL}$ maupun sokhletasi yaitu 49,984 $\mu\text{g/mL}$.

Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% karena flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar (Harborne, 1987). Menurut

penelitian Tsumbu dkk. (2011) menyatakan bahwa kandungan utama flavonoid daun singkong yaitu senyawa rutin. Berdasarkan penelitian dari Sari (2010) menyatakan bahwa komposisi etanol sebagai pelarut yang menghasilkan kadar rutin tertinggi pada daun singkong yang di ekstraksi dengan maserasi adalah etanol 96% dengan rata-rata kadar rutin $5.9664 \pm 2.4718 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini perlu dilakukan untuk pengembangan pengujian aktivitas antioksidan pada daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan metode ABTS yang sebelumnya sudah di uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Serta menguji kadar flavonoid total ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

B. Rumusan Masalah

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

1. Apakah ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS?
2. Berapakah kadar flavonoid total ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz)?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui adanya aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan metode ABTS.
2. Menentukan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada peneliti lain mengenai penggunaan daun singkong bisa digunakan 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)

Tanaman singkong mampu beradaptasi secara luas di daerah yang beriklim tropis. Di Indonesia, tanaman singkong atau ketela pohon dapat tumbuh dan berproduksi di daerah dataran rendah hingga dataran tinggi, yakni pada ketinggian antara 10 sampai 1500 mdpl. Daun muda (pucuk) pada tanaman singkong berwarna hijau muda sedangkan daun dewasa berwarna hijau tua dan bagian tiap daun berukuran <5 dengan jumlah tiap daun 5-6 helai dengan ujung daun meruncing, pertulangan daun pada permukaan atas dan bawah bagian pangkal, tengah serta ujung berwarna kuning (Restiani dkk., 2014). Daun singkong dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Daun singkong (dokumentasi 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
Order : Euphorbiales
Famili : Euphorbiaceae
Genus : Manihot
Spesies : *Manihot esculenta* Crantz (Singkong, ubi kayu, ketela pohon)
(Backer dan Brink, 1963; Steenis, 1981).

2. Khasiat dan kandungan kimia

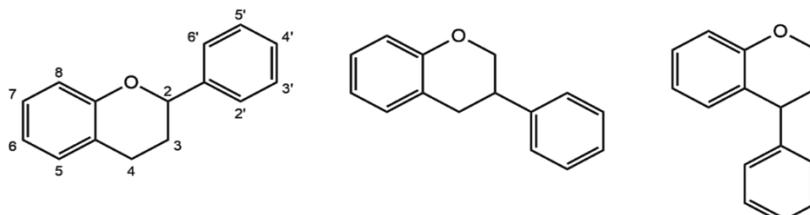
Tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki banyak manfaat. Bagian singkong yang umum dimanfaatkan oleh masyarakat adalah bagian umbi sementara pemanfaatan bagian daun masih terbatas sebagai sayuran terutama bagian pucuk, sedangkan daun bagian bawah sebagai pakan ternak. Daun singkong telah banyak digunakan masyarakat untuk mengobati diare dan sakit kepala (Sastroamidjojo 2001). Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, fenolik, dan saponin (Hasim dkk., 2016). Menurut penelitian Tsumbu dkk. (2011) menyatakan bahwa kandungan utama flavonoid daun singkong yaitu senyawa rutin. Flavonoid memiliki keuntungan yaitu sebagai senyawa yang memiliki efek biokimia dan termasuk sebagai senyawa yang

bisa digunakan sebagai antioksidan (Winarsi, 2007). Sehingga daun singkong dapat digunakan sebagai antioksidan.

3. Flavonoid

Flavonoid merupakan bagian penting dari produk alami, flavonoid termasuk dalam metabolit sekunder tanaman yang memiliki struktur polifenol, senyawa ini banyak ditemukan dalam berbagai bahan makanan, sayuran dan buah-buahan. Konsentrasi flavonoid lebih tinggi pada daun dibandingkan dengan jaringan yang lebih dalam. Flavonoid memiliki keuntungan yaitu sebagai senyawa yang memiliki efek biokimia dan termasuk sebagai senyawa yang bisa digunakan sebagai antioksidan (Winarsi, 2007).

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mengandung C_{15} atau 15 atom karbon dalam inti dasarnya. Struktur umum flavonoid dapat di gambarkan sebagai deretan senyawa $C_6-C_3-C_6$, dua cincin aromatic yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988). Flavonoid dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan perbedaan dari cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil (Suhartono, 2016) Kelompok tersebut yaitu flavonoid (*2-phenylbenzopyrans*), isoflavonoid (*3-benzopyrans*), dan neoflavonoid (*4-benzopyrans*). Perbedaan struktur dari flavonoid, isoflavonoid dan neoflavonoid dapat dilihat pada Gambar 2.

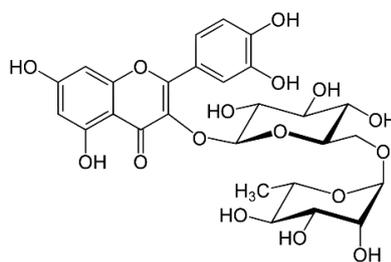


Gambar 2. Struktur umum flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid (Suhartono, 2016).

Flavonoid memiliki kelompok campuran polifenolat yang mempunyai berat molekul rendah, meliputi flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, flavanol atau katekin, dan antosianin (Winarsi, 2007). Flavonoid sebagai antiradikal yaitu dengan mereduksi radikal bebas seperti radikal superoksida, alkoksil, peroksil, dan hidroksil (Suhartono, 2016).

4. Rutin

Tumbuhan banyak mengandung glikosida flavonol salah satunya yaitu glikosida kuersetin yang paling umum dijumpai yaitu rutin (*3,3',4',5,7-penta hydroxyl flavon—rutinoside* atau $C_{27}H_{30}O_{16}$) biasa di sebut juga kuersetin-3-rutinosida yang memiliki berat molekul $610,512 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Rutin adalah suatu glikosida yang merupakan hasil kondensasi aglikon kuersetin dengan gula rutinosa. Warna yang didapat pada pembacaan UV senyawa rutin menghasilkan warna coklat redup atau kuning menyala (Harborne, 1987). Struktur kuersetin-3-rutinosida dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kuersetin-3-rutinosida (Harborne, 1987).

Rutin bersifat antioksidan, rutin dan kuersetin efeknya sebanding dalam menghambat pembentukan radikal bebas ion superoksida, radikal hidroksil dalam reaksi fenton dan radikal peroksi lipid (Winarsi, 2007).

Menurut penelitian Rusmana dkk. (2017) rutin dapat digunakan sebagai antioksidan dengan metode ABTS dengan menunjukkan nilai IC_{50} $17,16 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$. Sehingga rutin memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dan digunakan sebagai pembanding atau kontrol positif.

5. Maserasi

Esktraksi didefinisikan sebagai 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 flavonoid, minyak atsiri, alkaloid, fenolik, saponin dan lain-lain (Depkes RI, 2000).

Metode ekstraksi memiliki dua cara yaitu cara dingin dan cara panas, cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi sedangkan cara panas yaitu refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok. (Depkes RI, 2000). Metode ekstraksi yang digunakan yaitu dengan cara dingin menggunakan metode maserasi. Istilah maserasi berasal dari bahasa latin "macerare" yang memiliki arti mengairi, melunakkan, merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan direndam dalam pelarut yang akan digunakan dalam proses ekstraksi. Rendaman tersebut disimpan terlindungi dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan diaduk kembali. Waktu maserasi adalah berbeda-beda, masing-masing farmakope mencantumkan 3-10 hari. Namun pada 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 pengadukan 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).

6. Aktivitas antioksidan

Senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksigen sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menangkal efek negatif radikal bebas dalam tubuh dengan memberikan suatu elektronnya kepada senyawa radikal bebas. Radikal bebas dapat dihambat dengan cara mencengah dan menghambat terbentuknya radikal bebas baru, menangkap radikal bebas, pemutusan rantai dengan memotong propagasi dan memperbaiki kerusakan yang disebabkan radikal bebas. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007).

Antioksidan dapat berupa enzim (misalnya SOD atau superoksida dismutase, katalase), vitamin (misalnya vitamin A, C, E, dan β -Karoten), dan senyawa lain (misalnya flavonoid, albumin, bilirubin). Senyawa flavonoid terbukti mempunyai efek biologis yang sangat kuat yaitu sebagai antioksidan. Antioksidan banyak

ditemukan dalam sayuran, buah-buahan, biji-bijian, serta kacang-kacangan (Winarsi, 2007).

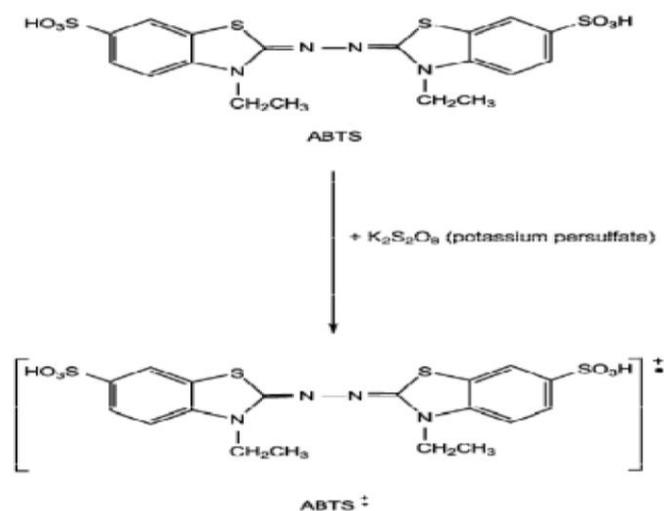
7. Metode ABTS

Antioksidan dapat diuji dengan menggunakan metode ABTS (*2,2-Azinobis 3-ethyl benzothiazoline 6- sulfonic acid*), senyawa ini merupakan senyawa radikal yang mengandung atom nitrogen. ABTS adalah substrat peroksidase bila dioksidasi oleh radikal peroksil atau oksidan lain dengan adanya H₂O₂ menghasilkan kation radikal metastabil ABTS yang berwarna pekat dan dapat dibaca secara spektrofotometri dalam range panjang gelombang 600-750 nm (Karadag dkk., 2009). Prinsip uji ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan penghilangan warna ABTS yang semula berwarna biru hijau akan berubah menjadi tidak berwarna apabila tereduksi oleh radikal bebas (Yu, 2008).

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah nilai konsentrasi efisien atau *Effect Concentration* (EC₅₀) atau *Inhibition Concentration* (IC₅₀) yaitu konsentrasi suatu antioksidan yang memberikan % peredaman sebesar 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi, mempunyai nilai IC₅₀ yang rendah (Molyneux, 2004). Parameter interpretasi hasil pengujian ABTS adalah dengan nilai IC₅₀. IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi dari larutan sampel yang mampu mereduksi aktivitas ABTS sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin besar aktivitas antioksidannya. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50

ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika bernilai 150-200 ppm (Blois, 1958).

Mengukur kapasitas antioksidan salah satunya yaitu dalam menurunkan warna $ABTS^+$ dengan mereaksikan secara langsung dengan $ABTS^+$. Kalium persulfat sebagai agen pengoksidasi dengan $ABTS^+$ dihasilkan secara langsung dengan hasil yang tinggi. Antioksidan selanjutnya bereaksi dengan $ABTS^+$ dan warna radikal $ABTS^+$ akan berkurang. Reaksi pembentukan radikal bebas $ABTS^+$ dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi pembentukan radikal bebas dari ABTS dengan kalium persulfat menjadi $ABTS^+$ dan reaksi pemerangkapan radikal bebas oleh antioksidan menjadi ABTS stabil kembali (Sami dan Rahimah, 2016).

8. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri serapan adalah pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Teknik yang digunakan dalam analisis farmasi yaitu spektroskopi serapan ultraviolet, cahaya tampak, inframerah dan serapan atom. Pengukuran spektrofotometri di dalam daerah cahaya tampak, semula disebut kolorimetri, tetapi istilah kolorimetri ini lebih tepat digunakan untuk persepsi tentang warna (Depkes RI, 2008).

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan. Dalam hukum Lambert-Beer 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 persamaan hukum Lambert-Beer yaitu ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) dimana A adalah absorbansi, ϵ adalah absorptivitas molar, b adalah tebal kuvet dan c adalah konsentrasi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Radiasi elektromagnetik salah satunya sinar ultraviolet dapat dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Spektrofotometri UV-Vis merupakan suatu analisis yang dapat menganalisis suatu senyawa, tahapan-tahapan yang harus diperhatikan dalam analisis spektrofotometri UV-Vis yaitu pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis, pemilihan panjang gelombang, waktu operasional (*operating time*), pembuatan kurva baku, dan pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan yaitu mereaksikan senyawa tersebut dengan pereaksi tertentu, pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa syarat yaitu reaksinya selektif, sensitif, cepat, kuantitatif, reproduksibel, dan hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama (Gandjar dan Rohman, 2007).

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal yaitu pada panjang gelombang maksimal kepekaannya juga maksimal, karena pada panjang gelombang maksimal tersebut perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar disekitar panjang gelombang maksimal, bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum lambert-beer akan terpenuhi, dan jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali ketika digunakan panjang gelombang maksimal (Gandjar dan Rohman, 2007).

Waktu operasional mempunyai tujuan yaitu untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan. Pada saat awal terjadi reaksi, absorbansi senyawa yang berwarna ini meningkat sampai waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama waktu pengukuran, maka ada kemungkinan senyawa yang berwarna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warnanya turun akibatnya absorbansinya juga turun. Karena alasan inilah, maka untuk pengukuran senyawa berwarna (hasil suatu reaksi kimia) harus dilakukan pada saat waktu operasional (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pembuatan kurva baku yaitu dibuat seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentersasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara

absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). bila hukum Lambert-Beer terpenuhi, maka kurva baku berupa garis lurus (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pembacaan absorbansi atau serapan pada sampel yang terbaca pada spektrofotometri hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmitansi. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa kesalahan dalam pembacaan T adalah 0,005 atau 0,5% (Gandjar dan Rohman, 2007).

F. Landasan Teori

Penyakit degeneratif, gangguan fungsi sel hingga kerusakan struktur sel akibat adanya radikal bebas didalam tubuh. Radikal bebas dapat dihambat menggunakan antioksidan, senyawa flavonoid telah terbukti digunakan sebagai antioksidan dengan cara menghambat mencegah terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) atau menangkap ROS secara langsung (Winarsi, 2007).

Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, fenolik, dan saponin (Hasim dkk., 2016). Penelitian (Tsumbu dkk., 2011) menyatakan bahwa kandungan utama flavonoid daun singkong yaitu senyawa rutin. Rutin digunakan sebagai kontrol positif.

Ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi, menurut penelitian dari Verawati dkk. (2017) yaitu membandingkan metode ekstraksi yaitu maserasi, perkolasi dan sokhletasi pada daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). Hasil perbandingan tersebut yaitu metode maserasi menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih baik yaitu dengan nilai IC_{50} 35,057 μ g/mL. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% karena flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai

sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar (Harborne, 1987).

Pengujian antioksidan menggunakan metode ABTS, merupakan pengembangan dari pengujian aktivitas pada daun singkong yang sebelumnya sudah diuji menggunakan metode DPPH.

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori tersebut, maka dapat diperoleh hipotesis yaitu:

- a. Ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antioksidan.
- b. Ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki kandungan flavonoid total.

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat yang digunakan

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah 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 uji aktivitas antioksidan adalah ABTS (*2,2 Azinobis (3-ethylbenothiazoline) 6-Sulfonic Acid*) (Merck), rutin, metanol p.a. (Merck), etanol p.a. (Merck), aquadest dan kalium persulfat ($K_2S_2O_8$). Bahan yang digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total adalah rutin, pereaksi $AlCl_3$ 10% (Merck), CH_3COOK , metanol p.a (Merck) dan etanol p.a. (Merck).

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 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, dan *rotary evaporator* (Heidolph). Seperangkat alat penetapan uji aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid total 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 yaitu daun singkong yang berwarna hijau muda dan segar, yaitu dari ujung batang yang masih muda. Menurut penelitian hasim dkk., (2016) menyatakan bahwa sampel daun singkong yang digunakan yaitu daun singkong yang terletak pada posisi keempat sampai tujuh dari pucuk tanaman.

2. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan untuk mengetahui identitas tumbuhan yang digunakan pada penelitian, yaitu tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Determinasi guna mencocokkan ciri-ciri tanaman singkong yang akan diteliti dengan ciri-ciri tanaman yang telah dikenal kuncinya dengan menggunakan buku dari (Backer dan Brink, 1963; Steenis, 1981). Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro dengan cara membawa sampel daun, batang, umbi singkong, dan akar. Tanaman singkong yang akan dideterminasi harus sesuai dengan tanaman singkong yang digunakan untuk penelitian, berasal dari sumber yang sama dengan tempat pengambilan daun singkong.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Pembuatan ekstrak daun singkong dari daun singkong yang dipetik langsung kemudian dilakukan sortasi dan pencucian dengan air mengalir, pengovenan untuk menghilangkan sisa kadar air dengan suhu 45°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. Daun singkong yang sudah kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan menggunakan penyerbuk elektrik serta diukur kadar airnya dengan alat *moisture balance*. Persyaratan kadar air pada simplisia kering sebelum dilakukan proses penyarian yaitu kurang dari 10 %. Serbuk yang diperoleh kemudian disimpan di tempat yang tidak terkena sinar matahari supaya tidak terjadi dekomposisi kandungan senyawa (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. 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 pada kecepatan 60 rpm sampai

tidak ada etanol yang menetes dan didapatkan ekstrak kental. 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. Ekstrak kental ditimbang dan dimasukkan dalam gelas yang dilapisi kertas gelap kemudian disimpan dalam destikator (Depkes RI, 1986).

5. Uji aktivitas antioksidan menggunakan 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 (7,33 mM) dan dibuat larutan $K_2S_2O_8$ sebanyak 165,56 mg ditambahkan aquadest sebanyak 250 mL (2,45 mM). Kedua larutan tersebut dicampur yaitu 25 mL larutan blanko ABTS dan 25 mL larutan $K_2S_2O_8$ kemudian labu ukur diselubungi dengan aluminium foil agar tidak terkena cahaya matahari. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam hingga tercampur rata agar reaksi yang terjadi dapat sempurna (Lee dkk., 2006).

b. Pembuatan larutan induk rutin

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 (400,4 ppm).

c. Pembuatan larutan induk larutan sampel

Ekstrak etanol daun singkong ditimbang 100,1 mg, kemudian dilarutkan ke dalam labu takar 100 ml menggunakan metanol p.a. (1001 ppm).

d. Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum

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 larutan 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 panjang gelombang 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 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) :

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

2) Uji aktivitas antioksidan daun singkong

Larutan stok sampel ekstrak etanol daun singkong 1001 ppm dipipet masing-masing 50 µl, 100 µl, 200 µl, 400 µl dan 800 µl, larutan 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) :

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

6. Penetapan kadar flavonoid total

a. Pembuatan larutan induk rutin

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 (400,4 ppm).

b. Pengukuran panjang gelombang (λ) maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan membuat larutan rutin pada konsentrasi 6 ppm, kemudian larutan tersebut diambil 0,2 mL ditambah 0,1 mL AlCl_3 10%; 0,1 ml Kalium asetat 1 M; 3,7 mL etanol p.a. dan ditambahkan aquadest hingga 5 mL. Larutan tersebut diukur menggunakan spektrofotometer visibel pada lamda 400-800 nm dengan nilai absorbansi larutan antara 0,2-0,8 (Chang dkk., 2002).

c. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* atau waktu operasional dilakukan dengan membuat larutan rutin pada konsentrasi 6 ppm, kemudian larutan tersebut diambil 0,2 mL ditambah 0,1 mL AlCl_3 10%; 0,1 ml Kalium asetat 1 M; 3,7 mL etanol p.a. dan ditambahkan aquadest hingga 5 mL. 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 (Chang dkk., 2002).

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 μL 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. Seri kurva baku diambil masing-masing sebanyak 0,2 mL ditambah 0,1 mL AlCl_3 10%; 0,1 ml Kalium asetat 1 M; 3,7 mL etanol p.a. dan ditambahkan aquadest

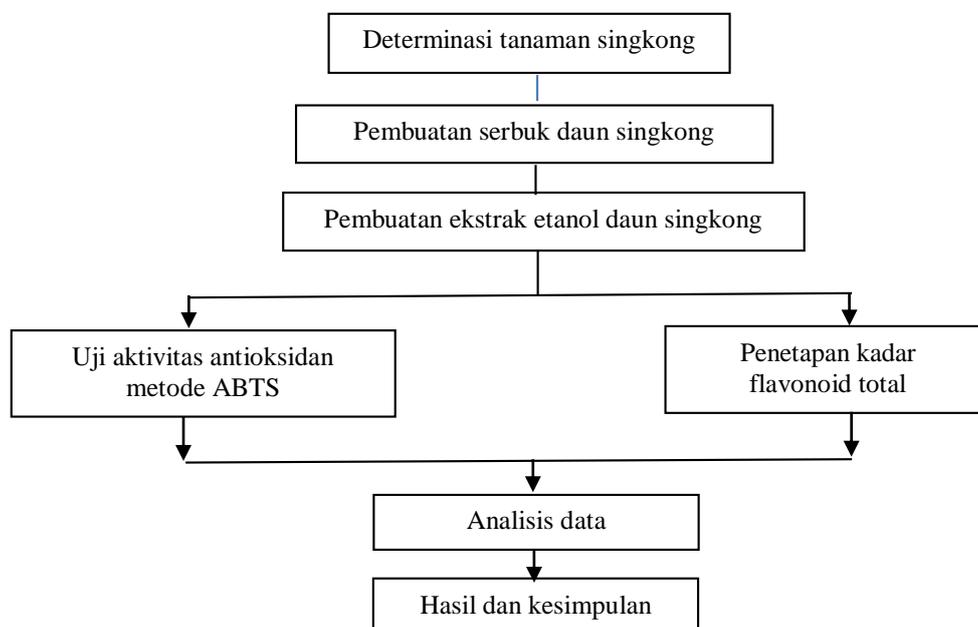
hingga 5 mL. Larutan tersebut didiamkan selama *operating time* kemudian diukur dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum (Chang dkk., 2002).

e. Pengukuran flavonoid total

Analisis kuantitatif flavonoid total pada ekstrak daun singkong dilakukan dengan metode spektrofotometri visibel menggunakan pereaksi aluminium klorida (AlCl_3). Larutan induk ekstrak daun singkong diencerkan dengan pengenceran 5 kali. Larutan induk daun singkong yang sudah diencerkan diambil sebanyak 0,2 mL ditambah 0,1 mL AlCl_3 10%; 0,1 ml Kalium asetat 1 M; 3,7 mL etanol p.a. dan ditambahkan aquadest hingga 5 mL. Larutan tersebut didiamkan selama *operating time* kemudian diukur dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum (Chang dkk., 2002).

C. Skema Jalannya Penelitian

Skema jalannya penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema jalannya penelitian

D. Analisis Data

Analisis data untuk uji aktivitas antioksidan dan penetapan kadar flavonoid total menggunakan regresi linier. Aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan regresi konsentrasi larutan uji dengan daya antioksidan. Kadar flavonoid total diperoleh dari substitusi nilai absorbansi sampel pada persamaan regresi kurva standar rutin dinyatakan dengan miligram rutin ekuivalen tiap gram sampel ekstrak etanol daun singkong.

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. Ekstrak etanol daun singkong memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS dengan nilai IC_{50} sebesar 69,867 ppm.
2. Ekstrak etanol daun singkong memiliki kadar flavonoid total sebesar 29,466 mgRE/g sampel.

B. Saran

Saran dari penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya yaitu identifikasi isolasi senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun singkong yang berperan sebagai antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C.A., R.C.B., dan Brink, V.D., 1963, *Flora of Java Volume I (III)*, NV. Noordhoff, Groningen, The Netherlands.
- Banjarnahor, Sofna, D.S., dan Artanti, N., 2014, Antioxidant properties of flavonoids, Pusat Penelitian Kimia-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Kawasan PUSPIPTEK, *Med J Indonesia*, Vol. 23, No. 4.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 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, *Cara Pembuatan Simplisia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986, *Sediaan Galenik*, Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta, 18-19.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, 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.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008, *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Fitriana, W.D., Sri F., dan Taslim E., 2015, Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-fraksi Daun Kelor (*Moringa oleifera*), *Prosiding Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains (657)*, Bandung.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 253-254, 353-360.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia; Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, Terbitan Kedua, Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro ITB, Bandung.

- Hasim, dkk., 2016, Pengaruh Perebusan Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Kadar Total Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidannya, *Current Biochemistry*, Volume 3 (3) : 116-127.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L., 2005, The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, Reviews, *J Agric Food Chem*, **53**, 6, 1841-56.
- Karadag, A., Beraat O., and Samim S., 2009, Review of Methods to Determine Antioxidant Capacitie, *Food Analysis Methods* 2:41–60.
- Lee, B.W., Lee, J.H., Gal, S.W., Moon, Y.H., dan Park, K.H., 2006, Selective ABTS Radical-Scavenging Activity of Prenylated Flavonoids from *Cudrania tricuspidata*, *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2, 427–432.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid Terjemahan Padmawinata K*, Penerbit ITB, Bandung.
- Molyneux, Philip, 2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 26(2) : 211-219.
- Oliveira, S.D., Souza, G.A., Eckert, C.R., Silva, T.A., Sobral, E.S., Favero, O.A., Ferreira, M.J.P., Romoff, P., dan 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.
- Pambudi, A., Syaefudin, Noriko, N., Swandari, R., dan Azura, P.R., 2014, Identifikasi Bioaktif Golongan Flavonoid Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.), *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*, **2**, 3, 178-187.
- Puspitasari, A.D., Susanti, E., dan Khustiana, A., 2019, Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Vitamin C Perasan Daging Buah Lemon (*Citrus limon* (L.) Osbeck) Menggunakan Metode ABTS, *Jurnal Ilmiah Teknosains*, Vol. V No. 2.
- Restiani, R., Roslim, D.I., dan Herman., 2014, Karakter Morfologi Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Hijau Dari Kabupaten Pelalawan, *JOM FMIPA*, 1(2):619-623.
- Rusmana, D., Wahyudianingsih, R., Elisabeth, M., Balqis, Maesaroh, dan Widowati, W., 2017, Antioxidant Activity of *Phyllanthus niruri* Extract, Rutin and Quercetin, *The Indonesian Biomedical Journal*, Vol.9, No.2, August 2017, p.84-90.

- 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-ethylbenzothiazolin)-6-asam sulfonat*), *J. Fitofarmaka Indonesia*, **2**, 2, 107-110.
- Sari, Veronika Y.C., 2010, Optimasi Komposisi Etanol dan Air Dalam Proses Maserasi Daun Singkong (*Manihot Folium*) Dengan Aplikasi *Simplex Lattice Design*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, Yogyakarta.
- Sastroamidjojo, S., 2001, *Obat Asli Indonesia*, Dian Rakyat, Jakarta.
- Septarini, N.M., dan Herawati, I.E., 2019, The Colorimetric Method for Determination of Total Alkaloids and Flavonoids Content in Indonesia Black Nightshade (*Solanum nigrum* L.), *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, Vol 9.
- Shirwakar, A., Rajendran, K., dan Kumar, C.D., 2004, In Vitro Antioxidant Studies of *Annona squamosal* Linn. Leaves, *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 42.
- Solichah, M., 2018, Uji Aktivitas Antioksidan Air Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.) dengan Metode ABTS (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya, *Skripsi*, Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
- Steenis, C.G.G.J.V., 1981, *Flora Untuk Sekolah Indonesia*, P.T. Pradnya Paramita, Jakarta.
- Suhartono, E., 2016, *Toksisitas Oksigen Reaktif Dan Antioksidan Di Bidang Kedokteran Dan Kesehatan*, Yogyakarta : Gosyen Publishing, 13, 166-168.
- Tsumbu, C.N., Dupont, G.B., Tits, M., Angenot, L., Franck, T., Serteyn, D., dan Mickalad, A.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, *Nutrients*, ISSN 2072-6643.
- Verawati, Nofandi, D., Petrmawati, 2017, Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Fenolat Total dan Aktivitas Antioksidan Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.), *Jurnal Katalisator*, Vol 2 No. 2 E-ISSN : 2502-0943.
- Voigt, R., 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi ke-5*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

Winarsi, H., 2007, *Antioksidan Alami & Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam kesehatan*, Yogyakarta : Kanisius, 12-19,177-191.

Yu, L., 2008, *Wheat Antioxidants*, *Jhon Wiley & Sons, Inc. All right reversved*, ISBN 978-0-470-04259-5.