

Effect of Boiled Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) on Total Phenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity

(Pengaruh Perebusan Daun Singkong (*Manihot esculenta* crantz) terhadap Kadar Total Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidannya)
Hasim^{1*}, Syamsul Falah¹, Lia Kusuma Dewi¹

¹*Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia*

Corresponding author: Dr. Hasim, DEA; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/ Fax. +62251-8423267; E-mail: hasimdea@yahoo.com

ABSTRACT

*Cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) widely used as vegetables in many regions. Cassava leaves contain many minerals such as Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca, P, K, S, contain crude protein, β -carotene and have an active compound of flavonoids, phenolic, and contain chlorophyll which is a natural antioxidant. The aims of this study were to analyze the effect of boiled cassava leaves on total phenolics, flavonoids, and its antioxidant activity. Cassava leaves extraction was done by maceration method to obtain the methanol extract and infundation method to get the water extract. Based on phytochemical test, cassava leaves contained alkaloids, flavonoids, phenolic, tannins, and saponins. The highest levels of total phenolics and flavonoids contained in the methanol extract of simplicia, 30.57 mg GAE/g and 881.33 mg RE/g, respectively. Cassava leaves extract had potential as an antioxidant with the highest inhibition of DPPH radicals produced by the methanol extract of simplicia with IC_{50} values of 92.10 mg/L and followed by methanol extract of boiled leaves, water extract of simplicia, and water extract of boiled leaves with IC_{50} 144.28, 155.76 dan 170.71 mg/L, respectively. In conclusion, the process of boiling cassava leaves could reduce total phenolic, total flavonoids and antioxidant activity.*

Keywords: *antioxidant, cassava leaves, DPPH, flavonoids, phenolics, *Manihot esculenta* Crantz*

ABSTRAK

*Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) banyak dipakai sebagai sayuran di berbagai daerah. Daun singkong diketahui mengandung senyawa kelompok fenolik khususnya flavonoid yang merupakan salah satu antioksidan alami. Tujuan penelitian ini adalah pengaruh perebusan daun singkong terhadap kadar total fenolik, flavonoid, dan aktivitas antioksidannya. Ekstraksi daun sing-*

kong dilakukan dengan metode maserasi untuk memperoleh ekstrak metanol dan metode infundasi untuk memperoleh ekstrak air. Berdasarkan uji fitokimia, daun singkong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, tannin, dan saponin. Kadar fenolik dan flavonoid total tertinggi terdapat pada ekstrak metanol simplisia daun singkong yaitu sebesar 30.57 mg GAE/g dan 881.33 mg RE/g. Ekstrak daun singkong berpotensi sebagai antioksidan dengan penghambatan DPPH tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol simplisia daun singkong yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 92.10 mg/L dan diikuti ekstrak metanol daun rebus, ekstrak air simplisia, dan ekstrak air daun rebus dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 144.28, 155.76 dan 170.71 mg/L. Proses perebusan daun singkong dapat menurunkan total fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan bila dibandingkan dengan simplisia daun singkong.

Kata kunci: antioksidan, daun singkong, DPPH, flavonoid, fenolik, *Manihot esculenta* Crantz

1. PENDAHULUAN

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan anggota famili *Euphorbiaceae* dijumpai banyak di daerah Asia, termasuk Indonesia. Bagian singkong yang umum dimanfaatkan oleh masyarakat adalah bagian umbi sementara pemanfaatan bagian daun masih terbatas sebagai sayuran terutama bagian pucuk, sedangkan daun bagian bawah sebagai pakan ternak. Daun singkong telah banyak digunakan masyarakat untuk mengobati diare dan sakit kepala (Sastroamidjojo 2001). Daun singkong diketahui memiliki kandungan senyawa aktif flavonoid dan fenolik (Faezah *et al.* 2013). Flavonoid dan fenolik merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman dan memiliki banyak fungsi, salah satunya sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan menghambat aktivitas radikal bebas dalam tubuh dengan cara memberikan elektron pada molekul radikal bebas sehingga molekul tersebut menjadi stabil.

Daun singkong umumnya diolah dengan cara direbus menggunakan air, pelarut yang umum digunakan untuk mengolah bahan pangan. Perebusan dapat mengurangi kandungan asam

sianida yang bersifat racun. Kandungan asam sianida dalam daun singkong dapat dikurangi melalui proses pengeringan, perendaman dalam air, dan perebusan. Penambahan unsur S dan vitamin B 12 juga dapat menurunkan pengaruh racun asam sianida (Askar 1996). Namun sampai saat ini belum diteliti pengaruh proses perebusan daun singkong terhadap kadar fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidannya. Oleh karena itu perlu dikaji efektifitas penggunaan air untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dalam daun singkong dibandingkan dengan pelarut metanol. Penggunaan metanol ini didasarkan pada hasil penelitian Yuslinda *et al.* (2012) yang menunjukkan ekstrak metanol daun singkong memiliki daya inhibisi terhadap radikal bebas DPPH paling tinggi dibandingkan ekstrak etanol (semipolar) dan ekstrak *n*-heksan (nonpolar).

Penelitian Sukrasno *et al.* (2005) menunjukkan ekstrak metanol:air beberapa sayuran mengandung flavonoid melalui identifikasi dengan HPLC. Sementara itu, penelitian Raghavendra (2013), menunjukkan ekstrak metanol *Mentha arvensis* dan *Spinacia oleracea* positif mengandung flavonoid.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, diketahui bahwa pelarut metanol dan air dapat mengekstrak kandungan senyawa flavonoid di dalam suatu tanaman.

Penelitian ini bertujuan menentukan pengaruh proses perebusan daun singkong terhadap kadar fenolik total, flavonoid, dan aktivitas antioksidannya.

2. METODOLOGI

Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang digunakan diperoleh dari kebun tanaman obat, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) Balai Penelitian Pertanian, Kementerian Pertanian, Bogor. Sampel daun singkong yang digunakan yaitu daun yang terletak pada posisi ke 4 - 7 dari pucuk tanaman yang berumur 6 bulan dan diambil pada bulan Januari 2014.

Ekstraksi daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dilakukan dengan metode maserasi dan infundasi sesuai dengan metode BPOM (2010). Sebelum proses ekstraksi dilakukan, sampel diberikan 2 perlakuan yang berbeda. Pembuatan simplisia dilakukan dengan cara, pertama sampel segar dicuci bersih dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C. Selanjutnya daun dihancurkan hingga menjadi serbuk (simplisia) dan diayak dengan ukuran 100 mesh. Perlakuan kedua, sampel dicuci dengan air mengalir kemudian direbus selama 3 menit pada suhu 100 °C kemudian dirajang halus.

Pembuatan ekstrak air pada penelitian ini menggunakan metode infundasi. Sampel daun singkong dari dua perlakuan yang berbeda ditimbang sebanyak 50 gram, lalu dimasukkan ke dalam gelas piala 1000 mL. Selanjutnya ke

dalam gelas piala ditambahkan air 500 mL (1:10), kemudian dipanaskan dengan penangas air pada suhu 90 °C selama 15 menit (terhitung sejak suhu mencapai 90 °C) sambil diaduk dengan batang pengaduk. Hasil ekstraksi yang diperoleh kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat daun singkong hasil penyaringan merupakan ekstrak air yang selanjutnya dipekatkan sampai membentuk pasta dan dianalisis.

Pembuatan ekstrak metanol daun singkong pada penelitian ini menggunakan metode maserasi, yaitu dilakukan dengan memasukan 150 gram sampel ke dalam gelas erlenmeyer dan ditambahkan 750 mL pelarut (1:5). Sampel dimaserasi selama 48 jam dengan menggunakan *shaker* pada suhu kamar. Sampel disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat sampel sebagai ekstrak metanol. Ekstrak air dan metanol yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50-60 °C hingga diperoleh ekstrak kasar berupa pasta. Selanjutnya rendemen masing-masing ekstrak dihitung dengan membagi bobot ekstrak hasil ekstraksi dengan bobot sampel awal.

Analisis Fitokimia Ekstrak Daun Singkong (Harbone 1984)

Analisis fitokimia ekstrak daun singkong dilakukan adalah uji alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan steroid, tanin, saponin serta fenolik.

Uji alkaloid menggunakan pereaksi Meyer, pereaksi Wagner, dan pereaksi Dragendorf dan uji flavonoid dengan menggunakan metanol dan asam sulfat. Asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat diperlukan untuk uji triterpenoid dan steroid. Uji tannin menggunakan larutan FeCl₃ 1 % sedangkan uji saponin melalui pengocokan

untuk melihat terbentuknya busa. Uji fenolik dilihat dari terbentuknya warna kuning hasil pemanasan sampel yang sudah ditambahkan metanol kemudian ditetesi NaOH.

Penentuan Kadar Total Fenolik (Singleton *et al.* 1999)

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar fenolik total yaitu metode *Folin Ciocalteu* dengan mengacu pada metode penelitian Singleton *et al.* (1999). Ekstrak daun singkong sebanyak 0.5 mL dicampurkan dengan 2.5 mL reagen *Folin Ciocalteu* 10 % (yang telah dilarutkan dalam akuades) dan 2.5 mL NaHCO_3 7.5 %. Campuran tersebut selanjutnya diinkubasi selama 45 menit pada suhu 45 °C. Absorban diukur pada panjang gelombang 765 nm masing-masing tiga kali ulangan. Standar yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi adalah standar asam galat dengan variasi konsentrasi 15, 20, 25, 30, dan 35 mg/L. Selanjutnya masing-masing standar diberi perlakuan yang sama dengan sampel ekstrak daun.

Penentuan Kadar Flavonoid Total (Chang *et al.* 2002)

Metode yang digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total yaitu metode AlCl_3 dengan merujuk pada metode Chang *et al.* (2002). Sebanyak 0.5 mL ekstrak dicampur dengan 1.5 mL metanol, 0.1 mL AlCl_3 10 %, 0.1 mL kalium asetat 1M dan 2.8 mL air destilata. Campuran selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, Absorban sampel diukur pada panjang gelombang 415 nm masing-masing tiga kali ulangan. Standar yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi adalah standar rutin

dengan variasi konsentrasi 100, 140, 180, 220, dan 260 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya masing-masing standar diberi perlakuan yang sama dengan sampel ekstrak daun.

Pengujian Antioksidan dengan Metode DPPH (Molyneux 2004)

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Masing-masing sampel dilarutkan dalam metanol dan dibuat dalam konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 mg/L. Selanjutnya sampel dipipet 1 mL dengan pipet mikro, kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0.1 mM dalam metanol. Campuran larutan ini dihomogenkan dan serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 517 nm (Molyneux 2004). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing konsentrasi larutan sampel. Larutan yang digunakan sebagai pembanding adalah asam askorbat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$.

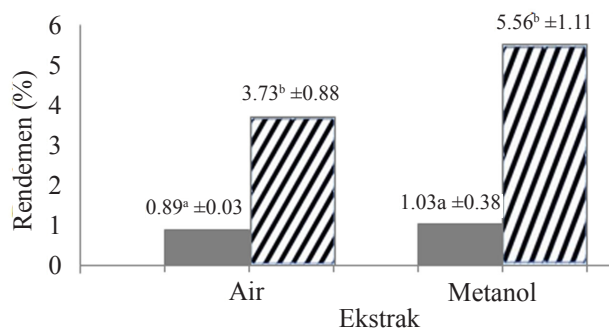
Aktivitas antioksidan ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH, yaitu dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorban blanko} - \text{absorban sampel}}{\text{absorban blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} selanjutnya dihitung berdasarkan konsentrasi dan persentase inhibisi menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh.

Analisis Statistik

Data penelitian dianalisis secara statistik menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap. Jika terdapat perbedaan yang nyata



^{a, b} menunjukkan korelasi berbeda atau tidak berbeda nyata antar data

Gambar 1 Rendemen ekstrak daun singkong daun rebus (hitam) dan simplisia (bergaris)

antara perlakuan yang diberikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan *software* SPSS 17.

3. Hasil

Rendemen Ekstrak Daun Singkong

Kadar air simplisia daun singkong diukur menggunakan metode gravimetri dengan tiga ulangan dengan hasil rata-rata 3.12 %. Ekstraksi bahan dilakukan dengan dua cara, yaitu maserasi dan infundasi. Maserasi dilakukan untuk

memperoleh ekstrak metanol dan infundasi untuk memperoleh ekstrak air. Pemilihan kedua metode ekstraksi ini didasarkan pada prosesnya yang sederhana dan memerlukan peralatan yang tidak terlalu banyak. Kedua metode ini menghasilkan rendemen yang berbeda (Gambar 1). Rendemen ekstrak metanol lebih tinggi (1.03 % dan 5.56 %) dibanding ekstrak air (0.89 % dan 3.73 %). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa aktif dalam daun singkong lebih banyak terekstrak oleh metanol dibanding air.

Komponen Fitokimia Ekstrak Daun Singkong

Hasil analisis komponen fitokimia ekstrak daun singkong terdapat pada Tabel 1. Senyawa fitokimia yang terdeteksi pada semua ekstrak yaitu alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, dan fenolik. Hasil positif ini didasarkan pada terbentuknya endapan atau perubahan warna yang terjadi. Senyawa triterpenoid dan steroid tidak terdeteksi baik pada ekstrak air maupun ekstrak metanol.

Tabel 1 Komponen fitokimia ekstrak daun singkong

Analisis	Ekstrak Air		Ekstrak Metanol	
	Simplisia	Daun Rebus	Simplisia	Daun Rebus
Alkaloid	+	+	+	+
• Meyer	+	+	+	+
• Wagner	+	+	+	+
• Dragendorf	+	+	+	+
Tanin	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	+
Triterpenoid	-	-	-	-
Steroid	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+
Fenolik	+	+	+	+

Keterangan :

+ : terbentuk warna/endapan

- : tidak terbentuk warna/endapan

Kadar Total Senyawa Fenolik

Kadar fenolik total hasil pengukuran menunjukkan simplisia daun singkong mengandung fenolik yang lebih banyak dibanding daun singkong yang telah direbus, baik pada ekstrak air maupun ekstrak metanol (Gambar 2).

Pada penelitian ini kadar total fenolik ditentukan dengan menggunakan asam galat sebagai standar sehingga konsentrasinya dinyatakan dalam GAE (Galat Acid Equivalent). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak simplisia daun singkong mengandung fenolik sebesar 30.70 mg GAE/g pada ekstrak metanol dan 24.38 mg GAE/g pada ekstrak air, lebih banyak dibanding ekstrak daun singkong rebus. Ditinjau dari jenis pelarut, ekstrak metanol mengandung fenolik total yang lebih tinggi dibanding ekstrak air, yaitu 17.70 mg GAE/g dan 30.57 mg GAE/g. Adapun kadar fenolik ekstrak air yaitu 15.98 mg GAE/g – 24.38 mg GAE/g.

Kadar Total Flavonoid

Hasil pengukuran kadar flavonoid total menunjukkan simplisia daun singkong mengandung flavonoid yang lebih banyak

dibanding daun singkong yang telah direbus, baik pada ekstrak air maupun ekstrak metanol (Tabel 2). Jika dikaji dari jenis pelarut, ekstrak metanol mengandung flavonoid total yang lebih tinggi dibanding ekstrak air, yaitu sebesar 304.17 mg RE/g dan 881.33 mg RE/g.

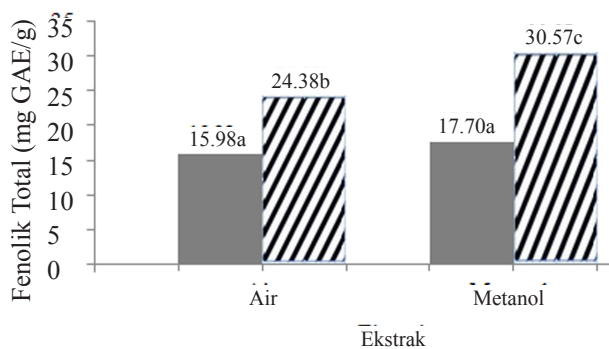
Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ekstrak daun singkong dinyatakan dalam IC₅₀ (Tabel 3), Dari Tabel tersebut dapat dilihat ekstrak metanol simplisia daun singkong memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar 92.10 mg/L. Sementara itu, ekstrak air daun singkong rebus memiliki aktivitas antioksidan terendah dengan nilai IC₅₀, sebesar 170.77 mg/L.

4. PEMBAHASAN

Rendemen Ekstrak Daun Singkong

Kadar air simplisia daun singkong diukur menggunakan metode gravimetri dengan tiga ulangan dengan hasil rata-rata 3.12 %. Hasil ini sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh Farmakope Herbal Indonesia (Depkes, 2008) yaitu di bawah 10 %. Hasil penelitian Bustan



^{a,b} menunjukkan korelasi berbeda atau tidak berbeda nyata antardata

Gambar 2 Kadar fenolik total ekstrak daun singkong. (hitam) daun rebus simplisia (bergaris)

Tabel 2 Kadar flavonoid total ekstrak air dan ekstrak metanol daun singkong

Sampel	Kadar flavonoid total (mg RE/g)
Ekstrak air daun singkong rebus	5.27 ^a
Ekstrak air simplisia daun singkong	7.23 ^a
Ekstrak metanol daun singkong rebus	304.17 ^b
Ekstrak metanol simplisia daun singkong	881.33 ^c

^{a,b,c} menunjukkan korelasi berbeda atau tidak berbeda nyata antardata

Keterangan : RE = Rutin Equivalent

Tabel 3 Aktivitas antioksidan ekstrak air dan ekstrak metanol daun singkong

Sampel	IC ₅₀ (mg/L)
Asam askorbat	69.13 ^a
Ekstrak air daun singkong rebus	170.77 ^b
Ekstrak air simplisia daun singkong	155.76 ^b
Ekstrak metanol daun singkong rebus	14428 ^b
Ekstrak metanol simplisia daun singkong	92.10 ^a

^{a,b} menunjukkan korelasi berbeda atau tidak berbeda nyata antardata

et al. (2008), menunjukkan jumlah rendemen ekstrak dipengaruhi oleh waktu ekstraksi, jenis pelarut, perbandingan jumlah pelarut dengan bahan, suhu ekstraksi, dan ukuran partikel sampel.

Komponen Fitokimia Ekstrak Daun Singkong

Analisis fitokimia dimaksudkan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dalam ekstrak tumbuhan sebagai langkah awal untuk mengetahui jenis komponen bioaktif yang terkandung sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut. Tumbuhan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi untuk melindungi tumbuhan dari mikroba (fungi dan bakteri) dan infeksi virus, radiasi sinar UV, serta melindungi tumbuhan dari serangan serangga (Aharoni dan Galili, 2010).

Berdasarkan Tabel 1, senyawa fitokimia yang terdeteksi pada semua ekstrak yaitu alkaloid, tannin, saponin, flavonoid, dan fenolik. Hasil penelitian Ebuehi *et al.* (2005) menunjukkan ekstrak air daun singkong mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, antraquinon, flobatinnin, dan saponin. Perbedaan hasil ini dikarenakan tidak dilakukannya pengujian

terhadap kandungan senyawa antraquinon dan flobatinnin pada penelitian ini. Adapun perbedaan kandungan senyawa metabolit sekunder suatu tanaman dapat disebabkan oleh berbedanya kondisi tempat tanaman tersebut tumbuh, seperti perbedaan suhu, pH, kondisi lahan, kelembaban tanah, ketersediaan air dan intensitas cahaya (Vinolina 2014).

Kadar Total Senyawa Fenolik

Penentuan kadar fenolik total bertujuan mengetahui jumlah keseluruhan senyawa golongan fenolik dalam sampel. Asam galat merupakan turunan asam hidroksibenzoat dan termasuk golongan asam fenolat sederhana yang sering digunakan sebagai standar karena memiliki substansi yang stabil dan murni serta lebih murah dibanding senyawa standar lainnya (Rahmawati, 2009).

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak simplisia daun singkong mengandung fenolik sebesar 30.70 mg GAE/g pada ekstrak metanol dan 24.38 mg GAE/g pada ekstrak air, lebih banyak dibanding ekstrak daun singkong rebus. Hal ini menunjukkan bahwa perebusan menurunkan kandungan senyawa fenolik sebanyak 32 % pada daun singkong, namun berdasarkan uji statistik tidak berbeda nyata. Penurunan ini terjadi karena umumnya panas memberikan efek destruktif pada senyawa fenolik yang bersifat sangat tidak stabil, sehingga senyawa tersebut mudah terlarut dalam air rebusan (Saika dan Mahanta 2013; Sun *et al.* 2012). Namun efek ini tidak berlaku untuk semua bahan pangan, karena pada beberapa penelitian justru terdapat kenaikan kadar total fenolik setelah perebusan dikarenakan panas hasil perebusan dapat memecah matriks sel tanaman dan membebaskan senyawa fenolik terikat

di dalamnya, sehingga jumlah senyawa fenolik terukur meningkat (Chumyam *et al.* 2013; Hidayat 2015). Selain itu, proses perebusan juga dapat menginaktivasi enzim polifenol oksidase selama pemanasan, yang kemudian mencegah terjadinya penurunan jumlah polifenol (Chuah *et al.* 2008).

Kadar fenolik ekstrak metanol hasil penelitian ini lebih rendah dibanding kadar fenolik yang diperoleh Suresh *et al.* (2011) yaitu 64 mg/g. Kadar fenolik ekstrak air hasil penelitian ini yaitu 15.98 mg GAE/g – 24.38 mg GAE/g lebih tinggi dibanding kadar fenolik yang diperoleh Faedah *et al.* (2013) yang berkisar 10.53 – 10.67 mg GAE/g sampel. Perbedaan kadar fenolik ini dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik yang akan menentukan proporsi kandungan senyawa kimia dalam tumbuhan. Kandungan senyawa metabolit sekunder dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat singkong tumbuh. Satu jenis tanaman yang sama bila ditanam di tempat yang berlainan akan memiliki kandungan metabolit sekunder yang berbeda (Yenni 2012).

Kadar Total Flavonoid

Penentuan kadar flavonoid total pada penelitian ini menggunakan metode kolorimetri dengan pereaksi $AlCl_3$. Prinsip dari metode ini adalah $AlCl_3$ membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keto, lalu dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu $AlCl_3$ juga akan membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus ortodihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (Chang *et al.* 2002). Penelitian Tsumbu *et al.* (2011) berhasil mengidentifikasi senyawa rutin (kuersetin-3-rutinosida) dalam daun singkong, yaitu senyawa flavonoid

golongan flavonol.). Sesuai dengan kandungan senyawa flavonoid di dalam daun singkong, rutin digunakan sebagai standar untuk membuat kurva kalibrasi. Kadar total flavonoid total hasil penelitian dinyatakan dalam mg rutin/g ekstrak (mg RE/g ekstrak).

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak simplisia daun singkong mengandung flavonoid yang lebih banyak dibanding ekstrak daun singkong yang telah direbus, baik pada ekstrak metanol maupun ekstrak air. Ekstrak air daun singkong yang telah direbus dan simplisia tidak menunjukkan adanya pengaruh yang nyata terhadap kadar flavonoid dalam daun singkong. Sama halnya dengan senyawa fenolik, kadar flavonoid akan berkurang ketika proses perebusan sehingga ekstrak dari daun yang telah direbus mengandung flavonoid lebih rendah. Hasil ini didukung oleh hasil penelitian Sukrasno *et al.* (2005) yang menunjukkan perebusan melepaskan kira-kira 50 % kandungan flavonoid daun singkong dalam air rebusan. Sementara menurut Fidrianny *et al.* (2007), flavonoid daun singkong terdistribusi dengan proporsi 65 % tertahan dalam ampas dan 35 % dalam air rebusannya. Adapun untuk mempertahankan jumlah flavonoid yang tertahan dalam ampas tetap tinggi, volume air yang digunakan untuk merebus 1 bagian (berat) daun singkong sebaiknya tidak lebih dari 10 bagian.

Berdasarkan pelarutnya, ekstrak metanol mengandung flavonoid total yang lebih tinggi dibanding ekstrak air, yaitu sebesar 304.17 mg RE/g dan 881.33 mg RE/g. Hal ini disebabkan oleh banyaknya gugus hidroksil pada senyawa flavonoid yang cenderung lebih mudah berikatan dengan metanol yang juga memiliki gugus hidroksil. Menurut Oktiani *et al.* (2009), dan Tsumbu *et al.* (2011), senyawa

flavonoid yang terkandung dalam daun singkong yaitu rutin, flavonoid jenis flavonol yang mengandung satu glikosida (monoglikosida). Monoglikosida ini menyebabkan kelarutan senyawa rutin dalam air rendah dan lebih larut dalam metanol. Banyaknya gugus glikosida akan meningkatkan kelarutan suatu senyawa dalam air dan mengurangi kelarutannya dalam pelarut organik (Anwariyah, 2011).

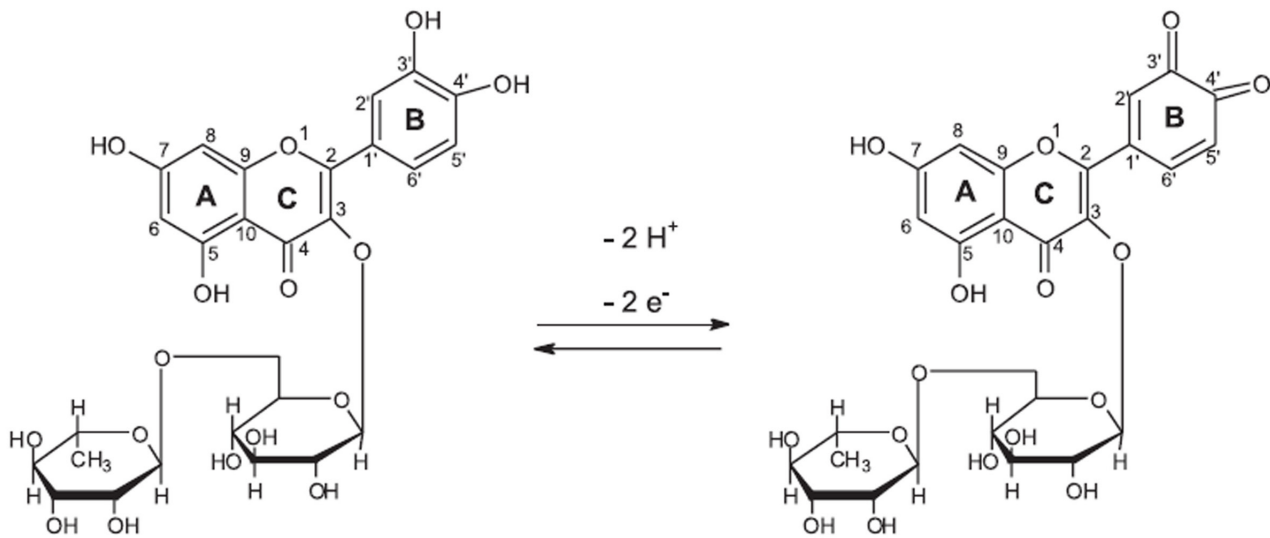
Kadar flavonoid ekstrak metanol dan ekstrak air hasil penelitian relatif lebih tinggi dibanding hasil penelitian Suresh *et al.* (2011) dan Faezah *et al.* (2013), yaitu 304.17 mg RE/g – 881.33 mg RE/g dan 5.27 mg RE/g – 7.23 mg RE/g. Kadar flavonoid ekstrak metanol daun singkong yang diperoleh yaitu 124 mg QE/g. Sama halnya dengan kadar fenolik total, perbedaan kadar flavonoid total ini dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik yang akan menentukan proporsi kandungan senyawa kimia dalam tumbuhan (Yenni 2012). Perbedaan kadar flavonoid kemungkinan disebabkan oleh jenis standar yang digunakan berbeda. Penelitian ini menggunakan standar rutin dalam pembuatan kurva kalibrasi sehingga kadar flavonoid total dinyatakan dalam mg rutin/g ekstrak (mg RE/g). Adapun penelitian lain menggunakan standar kuersetin dan katekin sehingga kadar flavonoid total masing-masing dinyatakan dalam mg kuersetin/g ekstrak (mg QE/g) dan mg katekin/g ekstrak (mg CE/g).

Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui kapasitas senyawa aktif dalam ekstrak untuk menangkal radikal bebas. Aktivitas antioksidan ekstrak daun singkong diukur menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metode DPPH telah

banyak digunakan dalam analisis antioksidan seperti pada penelitian Anwariyah (2011), yang mengaji aktivitas antioksidan *lamun Cymodocea rotundata* dengan metode DPPH.

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh, ekstrak metanol simplisia daun singkong memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 92.10 mg/L dan tergolong antioksidan kuat. Berdasarkan uji statistik, ekstrak metanol simplisia daun singkong dan asam askorbat tidak menunjukkan adanya pengaruh yang nyata terhadap penghambatan aktivitas radikal bebas DPPH. Hal ini ditunjukkan oleh nilai IC_{50} yang tidak terlalu berbeda antara ekstrak metanol simplisia daun singkong dan asam askorbat, yaitu 92.10 mg/L dan 69.13 mg/L. Sementara itu, aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun rebus dan ekstrak air masing-masing tergolong sedang dan lemah dengan hasil analisis statistik tidak menunjukkan perbedaan daya inhibisi yang nyata antara ketiga ekstrak tersebut. Menurut Widyawati *et al.* (2010), perbedaan aktivitas antioksidan dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti perbedaan kemampuan dalam mentransfer atom hidrogen ke radikal bebas, struktur kimia senyawa antioksidan, dan pH campuran reaksi. Aktivitas antioksidan juga dipengaruhi oleh jumlah serta posisi gugus hidroksil dan metil pada cincin. Molekul yang lebih banyak memiliki gugus hidroksil akan semakin kuat dalam menangkap radikal bebas karena kemampuannya dalam mendonorkan atom hidrogen semakin besar. Hal ini sesuai dengan Andayani *et al.* (2008), yang menyatakan senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan umumnya memiliki gugus hidroksil yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus –OH dan –OR.

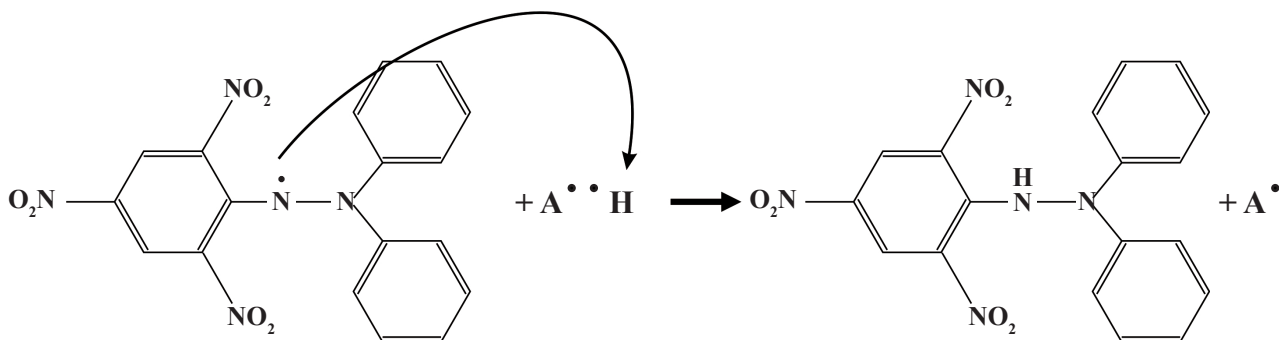


Gambar 3 Reaksi oksidasi senyawa rutin (Dos Santos, 2008)

Aktivitas antioksidan ekstrak daun singkong ini disebabkan karena kandungan senyawa fenolik dan flavonoid di dalamnya. Hal tersebut dikuatkan oleh hasil analisis komponen fitokimia yang menunjukkan ekstrak air dan ekstrak metanol daun singkong positif mengandung senyawa flavonoid dan fenolik. Berdasarkan hasil penelitian, aktivitas antioksidan dan kadar fenolik serta flavonoid total menunjukkan korelasi positif, semakin tinggi kadar fenolik dan flavonoid maka aktivitas antioksidan semakin tinggi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Faedah *et al.* (2013), yang menunjukkan adanya

korelasi positif antara total fenolik, flavonoid, dan aktivitas antioksidan. Tsumbu *et al.* (2011), berhasil mengidentifikasi senyawa rutin dalam daun singkong yang diperkirakan merupakan senyawa yang berperan dalam penghambatan aktivitas radikal bebas. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Zielin'ska *et al.* (2010), yang menunjukkan senyawa rutin memiliki kontribusi yang besar terhadap aktivitas antioksidan kecambah gandum.

Rutin merupakan senyawa flavonoid glikosida golongan flavonol dan memiliki gugus gula yang berikatan dengan satu gugus



Gambar 4 Reaksi reduksi DPPH oleh donor atom hidrogen seperti senyawa flavonoid menjadi DPP Hidrazin (Molyneux, 2004)

hidroksil. Senyawa rutin dalam daun singkong akan mengalami oksidasi (Gambar 3) dan mentransfer atom hidrogen kepada DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan pada satu atom nitrogen. Elektron bebas pada atom nitrogen ini selanjutnya direduksi oleh atom hidrogen dari senyawa rutin sehingga terbentuk molekul diamagnetik berwarna kuning yang stabil yaitu 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine atau DPP Hidrazin seperti yang tertera pada Gambar 4 (Irianti *et al.* 2011).

Analisis komponen fitokimia ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menunjukkan ekstrak air dan ekstrak metanol daun singkong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, fenolik, dan saponin. Kadar total senyawa fenolik dan flavonoid tertinggi terdapat pada ekstrak metanol simplisia daun singkong yaitu sebesar 30.57 mg GAE/g dan 881.33 mg RE/g. Persen penghambatan radikal bebas DPPH tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol simplisia daun singkong dengan nilai IC₅₀ sebesar 92.10 mg/L yang tergolong antioksidan kuat.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Aharoni A, Galili G. 2010. Metabolic Engineering of The Plant Primary-Secondary Metabolism Interface. *Current Opinion Biotech.* 22: 1-6.
- Anwariyah S. 2011. Kandungan fenol, komponen fitokimia dan aktivitas antioksidan lamun *Cymodocea rotundata*. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- BPOM. 2010. *Acuan Sediaan Herbal Volume Kelima Edisi Pertama*. Jakarta (ID): Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Bustan MD, Febriyani R, Pakpahan H. 2008. Pengaruh waktu ekstraksi dan ukuran partikel terhadap berat oleoresin jahe yang diperoleh dalam berbagai jumlah pelarut. *J Tek Kim.* 15:16-26.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 10(2):178-182.
- Chuah MA, Lee Y, Yamaguchi T, Takamura H, Yin L, Matoba T. 2008. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chem.* 111(1):20-28.
- Chumyarn A, Wangchai K, Jungklang J, Faiyue B, Saengnil K. 2013. Effects of heat treatment on antioxidant capacity and total phenolic content of four cultivars of purple skin eggplant. *Sci. Asia.* 39:246-251.
- Depkes RI (Departemen Kesehatan RI). 2008. *Farmakope Herbal Indonesia, Edisi I*. Jakarta (ID): Depkes RI.
- Ebuehi OAT, Babalola O, Ahmed, Z. 2005. Phytochemical, nutritive and anti-nutritive composition of cassava (*Manihot esculenta* L) tubers and leaves. *Nigerian Food J.* 23:40-46.
- Faezah N, Aishah SH, Kalsom UY. 2013. Comparative evaluation of organic and inorganic fertilizers on total phenolic, total flavonoid, antioxidant activity and cyanogenic glycosides in cassava (*Manihot esculenta*). *Afric J Biotech.* 12(18):2414-2421.
- Fidrianny I, Sukrasno, Wirasutisna KR. 2007. Pengaruh perebusan terhadap kandungan flavonoid dalam daun singkong. *J Obat Bahan Alam.* 6(2):55-59.
- Harborne JB. 1984. *Phytochemical Methods*, 2nd ed. New York (US): Chapman and Hall.
- Hidayat, GF. 2015. Pengaruh perebusan terhadap aktivitas biologis dan kandungan fenolik buah takokak (*Solanum torvum* Swartz). [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

- Irianti T, Puspitasari A, Suryani E. 2011. Aktivitas penangkapan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil oleh ekstrak etanolik batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers) dan fraksi-fraksinya. *Majalah Obat Tradisional*. 16(3):138-144.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J Sci Tech*. 26: 211-219.
- Oktiani R, Aldi Y, Bakhtiar A. 2009. Uji aktivitas bioflavonoid rutin dari daun singkong (*Manihot uttillissima* Pohl) terhadap waktu pembekuan darah dan jumlah sel trombosit. *Artikel Hibah Strategis Nasional*.
- Raghavendra M, Reddy AM, Yadav PR, Raju AS, Kumar LS. 2013. Comparative studies on the *in vitro* antioxidant properties of methanolic leafy extracts from six edible leafy vegetables of India. *Asian J Pharm Clinic Res*. 6 (3):96-99.
- Rahmawati A. 2009. Kandungan fenol total ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*). [Skripsi]. Jakarta (ID): Universitas Indonesia.
- Saika S, Mahanta CL. 2013. Effect of steaming, boiling, and microwave cooking on the total phenolics, flavonoids, and antioxidant properties of different vegetables of Assam, India. *IJFANS* 2(3):47-53.
- Sastroamidjojo S. 2001. *Obat Asli Indonesia*. Jakarta (ID): Dian Rakyat.
- Singleton V., Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299:152-178.
- Sukrasno, Durin SM, Fidrianny I. 2005. Kandungan flavonoid dalam sayuran segar dan hasil olahannya. [Skripsi]. Bandung (ID): Institut Teknologi Bandung.
- Sun L, Bai X, Zhuang Y. 2012. Effect of different cooking methods on total phenolic contents and antioxidant activities of four Boletus mushrooms. *J Food Sci Tech*, 51(11):3362-3368.
- Suresh R, Saravanakumar M, Suganyadevi P. 2011. Anthocyanins from indian cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antioxidant properties. *Intern Pharm Sci Res*. 2(7):1819-1828.
- Tsumbu CN, Dupont GD, Tits M, Angenot L, Franck T, Serteyn D, Mickalad AM. 2011. Antioksidan dan antiradikal activities of *Manihot esculenta* Crantz (*Euphorbiaceae*) leaves and other selected tropical green vegetables investigated on lipoperoxidation and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) activated monocytes. *Nutrients*. 3:818-838.
- Vinolina NS. 2014. Peningkatan produksi centellosida pada pegagan (*Centella asiatica*) melalui pemberian fosfor dan metil jasmonat dengan umur panen yang berbeda. [Disertasi]. Sumatera Utara (ID): Universitas Sumatera Utara.
- WHO. 1998. *Quality Control Method for Medicinal Plant Material*. Geneva: World Health Organization.
- Widyawati PS, Wijaya CH, Harjosworo PS, Sajuthi D. 2010. Pengaruh ekstraksi dan fraksinasi terhadap kemampuan menangkap radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ekstrak dan fraksi daun beluntas (*Pluchea indica* Less.). Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. ISSN:1411-4216.
- Yenni. 2012. Ameliorasi tanah sulfat masam potensial untuk budidaya tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.). *J Lahan Suboptimal*. 1(1): 40-49.
- Yuslinda E, Mukhtar H, Khairunnisa. 2012. Penentuan aktivitas antioksidan dari beberapa ekstrak sayur-sayuran segar dan dikukus dengan metode DPPH. *Scientia*. 2(1): 1-5.
- Zielin'ska D, Szawara-Nowak D, Zielin'ski H. 2010. Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies. *Polish J Food Nutr Sci*. 60(4):315-321.