

1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki berbagai macam keanekaragaman hayati. Keanekaragaman hayati yang ada dimanfaatkan masyarakat untuk berbagai olahan makanan dan minuman. Olahan minuman yang diciptakan tidak hanya bertujuan untuk menyegarkan tubuh tetapi juga memberikan khasiat kesehatan. Penggunaan tanaman herbal di Indonesia, sudah dilakukan sejak dahulu. Menurut Sutardi (2006), tanaman herbal merupakan tanaman yang memiliki khasiat kesehatan yang diolah secara tradisional yang diturunkan oleh nenek moyang, berdasarkan adat istiadat, kepercayaan dan nilai-nilai yang dianut, dan bersifat ilmu pengetahuan tradisional. Menurut Silalahi (2006) makanan dan minuman fungsional adalah makanan yang memiliki fungsi kesehatan selain fungsinya sebagai pemenuh zat gizi dasar. Tanaman herbal dapat digunakan sebagai makanan dan minuman fungsional yang memberi manfaat kesehatan. Sehingga, konsumsi minuman herbal sebagai alternatif untuk menjaga kesehatan tubuh banyak digunakan sebagai pencegah berbagai penyakit dan peningkat daya tahan tubuh.

Tanaman herbal khususnya daun pegagan digunakan sebagai obat tradisional dari tahun 1887. Pegagan memiliki sebaran tumbuh yang luas di daerah tropis Asia. Pegagan merupakan tanaman liar yang dapat ditemukan di semua musim. Pegagan banyak tumbuh di daerah dengan tanah lembap dan ditempat yang terlindung matahari (Sutardi, 2016). Berdasarkan uji pendahuluan yang dilakukan, daun pegagan (*Centella asiatica L. Urban*) kering dengan *pre-treatment* CaCl 0,5% dan *steam blanching*, memiliki kandungan antioksidan sebanyak 87% menggunakan metode DPPH *scavenging activity*. Antioksidan yang terdapat pada pegagan ini, berkhasiat untuk menyembuhkan berbagai penyakit seperti lemah syaraf, demam, bronkhitis, kencing manis, tekanan darah tinggi, penambah nafsu makan, untuk menjaga vitalitas dan untuk merevitalisasi tubuh dan otak yang kelelahan (Kristina *et al.*, 2009). Selain itu, antioksidan dalam pegagan dapat meningkatkan sistem imun tubuh. Kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam daun pegagan adalah triterpenoid, flavonoid, steroid, alkaloid dan saponin (Sutardi, 2016).

Metode pengolahan tanaman herbal sebagai minuman yang sering dilakukan masyarakat adalah dengan menyeduh (*infusion*), merebus (*decoction*), *tinctures* (ekstraksi

menggunakan alkohol/air), maserasi (*cold soaking*), dan dikonsumsi langsung (Nafiu, 2017). Pengolahan pegagan sebagai minuman herbal untuk meningkatkan sistem imun tubuh biasanya dikonsumsi secara oral dengan membuat ramuan, dan dilakukan dengan cara merebus dan menyeduh daun segar/keringnya. Menurut Puspitasari dan Desrita (2019) perbedaan suhu dan waktu pada proses pengolahan tanaman herbal dapat mengubah kandungan senyawa yang digunakan untuk menangkal radikal bebas dan mengurangi resiko terjadinya oksidasi. Berdasarkan penelitian Jin *et.al.*, (2019) penggunaan suhu tinggi dan waktu penyeduhan dapat mempengaruhi jumlah metabolit yang terekstrak. Oleh karena itu, diperlukan studi yang membahas kandungan antioksidan dan fenol berdasarkan metode preparasi minuman herbal secara tradisional, untuk mengetahui cara preparasi minuman terbaik.

1.2 Tinjauan Pustaka

1.2.1 Pegagan

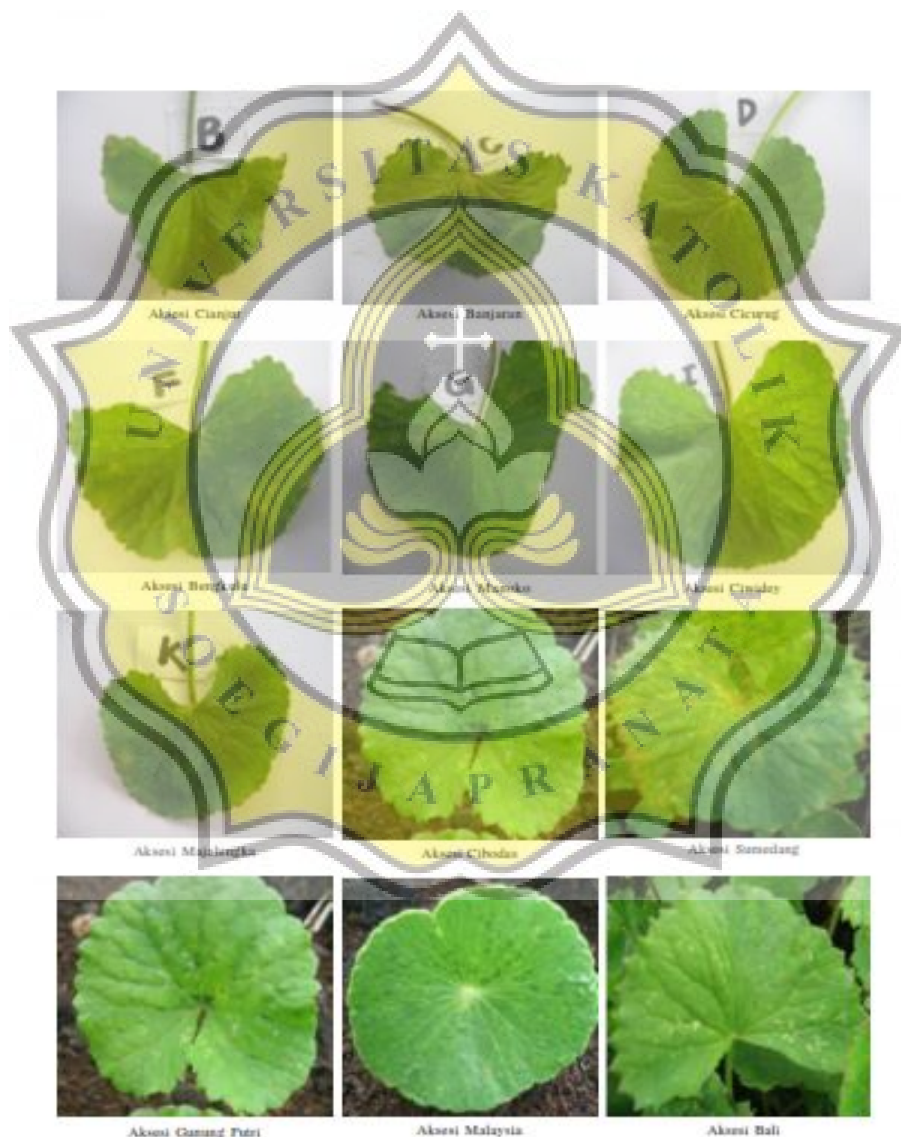
Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman liar dan sudah banyak dimanfaatkan menjadi tanaman obat. Tanaman ini banyak ditemukan di daerah tropis Asia pada ketinggian 700-2500 mdpl (Sutardi, 2016).



Gambar 1. Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) (Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Pegagan mudah ditemukan di tanah lembap perkebunan, ladang, pinggir jalan dan disepanjang pematang sawah, yang seringkali dianggap sebagai tanaman hama. Pegagan termasuk dalam tanaman *shade plant* sehingga tidak membutuhkan terlalu banyak sinar matahari dan memiliki laju respirasi yang rendah. Terpaparnya pegagan dengan sinar

matahari yang terlalu banyak akan berpengaruh pada morfologi dan kandungan senyawa bioaktif yang dimiliki. Senyawa bioaktif yang dimiliki pegagan antara lain, triterpenoid, minyak atsiri, flavonoid, fitosterol. Senyawa asiatikosida dalam pegagan yang termasuk dalam kelompok triterpenoid bermanfaat untuk meningkatkan sistem imun, memperlancar peredaran darah pada tubuh manusia dan memberikan efek tenang. Selain itu adanya senyawa brahmosida yang dapat membantu memperlancar peredaran darah ke otak dan merupakan protein penting sel otak akan membantu tubuh untuk terevitalisasi (Sutardi, 2006).



Gambar 2. 12 Aksesi Daun Pegagan (*Centella asiatica*(L.)) Urban
(Sumber: Sutardi, 2006)

Pegagan tersebar di daerah India, Asia, Afrika, Amerika Utara dan Amerika Selatan dan memiliki banyak varian. Varian yang paling terkenal adalah *Centella asiatica* (L.) Urban. Di Indonesia, diketahui terdapat 16 aksesori pegagan / antanan yang tersebar dari Aceh hingga Papua ((Bermawie *et.al*, 2008). Bermawie *et.al* (2008) telah melakukan karakterisasi dan evaluasi aksesori pegagan dari berbagai wilayah di Indonesia yakni, Ciwidey, Cibodas, Cianjur, Banjarnegara, Cicurug, Bali, Malaysia, Manoko, Sumedang, Gunung Putri, Majalengka dan lain-lain. Karakterisasi aksesori dapat dilakukan dengan penilaian kualitatif dengan mengamati bentuk daun muda dan tua, bentuk tepi daun, permukaan daun, warna daun muda dan tua, warna buku, warna bunga, warna tangkai bunga, warna geragih dan warna batang. 12 macam jenis aksesori dapat dilihat pada Gambar 2. Dimana, aksesori Majalengka telah diteliti memiliki kandungan asiaticosida dan flavonoid yang tinggi (Bermawie *et.al*, 2008).

Senyawa Flavonoid, triterpenoid, saponin, dan steroid yang terkandung dalam pegagan merupakan antioksidan alami yang biasanya digunakan dalam pembuatan obat herbal. Senyawa Flavonoid yang berperan sebagai antioksidan pada daun pegagan adalah kuersetin dan glikosida. Senyawa triterpenoid adalah senyawa yang memiliki struktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat. Senyawa terpenoid yang terkandung dalam pegagan seperti asam asiatic dan asiaticosida menjadi dasar berkembangnya ekstrak tanaman ini untuk mengatasi penyakit yang berhubungan dengan otak (Sutardi, 2006). Salah satunya, seperti penelitian Rao *et.al* (2005) yang membuktikan bahwa senyawa asiaticosida dapat meningkatkan biosintesis neurotransmitter, arborisasi dendrit dan myelinisasi akson dengan mencegah kerusakan sel-sel syaraf akibat stress oksidatif. Sedangkan penelitian lain, menunjukkan bahwa pegagan memiliki manfaat farmakologi lain seperti untuk obat luka luar, antidepresan, antiepileptik, penguatan aliran darah, dan luka lambung (Gohil *et al.*, 2010). Penelitian klinis yang dilakukan Belcaro *et.al* (1990) menyatakan bahwa ekstrak pegagan yang dikonsumsi oral 3 kali sehari sebanyak 60mL selama 2 bulan, dapat meningkatkan sirkulasi mikro dan permeabilitas kapiler pada aliran darah pasien hipertensi.

1.2.2 Antioksidan

Radikal bebas dikenal sebagai penyebab timbulnya penyakit degeneratif. Menurut Mandal *et al.* (2009), radikal bebas akan menyebabkan stress oksidatif dalam jaringan, karena radikal bebas merupakan senyawa/molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan, sehingga bersifat reaktif dan cepat membentuk reaksi oksidatif pada molekul lain yang menyebabkan ketidakstabilan molekul dan menginisiasi pembentukan radikal bebas lain. Ketidakseimbangan antara ROS (Reactive Oxygen Species) dengan pertahanan antioksidan tubuh ini, menyebabkan kerusakan sel dan timbulnya berbagai penyakit degeneratif (Silalahi, 2006).

Berdasarkan sumbernya radikal bebas dapat dibedakan menjadi radikal endogen dan radikal eksogen. Radikal endogen adalah radikal bebas yang berasal dari reaksi-reaksi yang terjadi dalam tubuh. Contohnya adalah proses auto-oksidasi, oksidasi enzimatik dan *respiratory burst*. Proses auto-oksidasi adalah proses oksidasi molekul yang menghasilkan kelompok oksigen reaktif dikarenakan tereduksinya oksigen. Molekul yang dapat mengalami auto-oksidasi adalah hemoglobin, mioglobin, Sitokrom C yang tereduksi dan tiol. Molekul ini akan menghasilkan superoksida, bentuk awal dari radikal bebas. Proses oksidasi enzimatik dapat menghasilkan sejumlah radikal bebas yang berasal dari reaksi enzimatik yang terjadi didalam tubuh. Contohnya oksidasi aldehyde, oksidasi asam amino, dan sintesis prostaglandin. *Respiratory burst* juga menyumbang sejumlah radikal bebas dalam tubuh, dimana sel fagositik akan menggunakan oksigen tubuh sebesar 70-90% untuk melakukan proses fagositosis yang akan menghasilkan superoksida. Radikal eksogen adalah radikal bebas yang berasal dari luar tubuh. Terpaparnya tubuh dengan polusi lingkungan, asap, obat-obatan, dan radiasi matahari dapat menyumbang sejumlah radikal bebas dalam tubuh (Iswari, K, 2011).

Antioksidan adalah senyawa aktif yang mudah teroksidasi oleh karena adanya radikal bebas. Antioksidan dapat dibedakan menjadi antioksidan endogen dan eksogen berdasarkan sumbernya. Antioksidan endogen adalah antioksidan yang terdapat didalam tubuh secara alami seperti enzim *Superoxida Dismutase* (SOD). Sedangkan antioksidan eksogen adalah antioksidan yang dapat diperoleh dari luar tubuh dengan mengkonsumsi makanan, seperti pro vitamin A, vitamin C, E, α -tocopherol, flavonoid, thymoquinone,

statin, siasin, phyocyanin dan lainnya. Cara kerja antioksidan yaitu dengan mencegah keadaan stress oksidatif atau kondisi ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dan jumlah antioksidan dalam tubuh. Antioksidan yang mudah teroksidasi akan melindungi molekul lain dalam sel, dari proses oksidasi oleh radikal bebas atau oksigen reaktif dengan beroksidasi terlebih dahulu (Werddhasari, 2014).

Menurut Madhavi *et.al.*,(1996), antioksidan dapat dibedakan berdasarkan sumbernya yaitu alami dan sintesis. Antioksidan buatan adalah antioksidan yang berasal dari derivat antioksidan alami dan sengaja dibuat. Contohnya BHT (*Butylated Hidroxy Toluena*) dan BHA (*Butylated Hidroxy Anisole*). Antioksidan alami adalah antioksidan yang terdapat secara alami di dalam tumbuhan dan tubuh. Contohnya adalah flavonoid yang merupakan senyawa fenol yang banyak ditemukan di alam dan SOD (Sutardi, 2016).

Senyawa fenol merupakan senyawa yang memiliki cincin aromatik dan memiliki 2 gugus hidroksil. Senyawa fenol lebih mudah larut dalam air karena berikatan dengan glikosida dan terdapat pada vakuola sel. Pengujian senyawa fenolik dapat dilakukan dengan menggunakan larutan Folin-Ciocalteu. Analisa ini didasarkan pada reduksi gugus hidroksil yang terdapat dalam cincin aromatik oleh senyawa fosfomolibdat pada reagen Folin-Ciocalteu, sehingga membentuk kompleks warna biru (Widyawati *et.al.*, 2018).

Berdasarkan cara kerjanya antioksidan dalam tubuh dapat dibedakan menjadi 3 yaitu, antioksidan primer, sekunder dan tersier. Antioksidan primer, seperti flavonoid, glutanion peroksidase, dan tiol, akan mencegah radikal bebas dengan mengubah radikal bebas menjadi senyawa yang tidak merugikan tubuh. Antioksidan sekunder, seperti vitamin C, vitamin E, β -karoten, akan menangkap dan mencegah terjadinya reaksi berantai oleh radikal bebas. Sedangkan antioksidan tersier, berfungsi untuk memperbaiki sel biomolekular yang rusak oleh karena adanya radikal bebas, contohnya adalah DNA *repairenzim*. (Silalahi, 2006).

Menurut Alves *et.al* (2014) warna dapat digunakan sebagai parameter untuk melihat kandungan senyawa antioksidan dalam suatu bahan pangan. Hal ini didukung dengan penelitiannya, tentang hubungan warna madu dengan kandungan flavon, flavonol,

senyawa fenolik dan kapasitas antioksidan. Warna yang lebih terang menandakan kandungan antioksidan yang lebih rendah dibandingkan warna yang lebih gelap. Menurut penelitian yang dilakukan Lantano *et.al.* (2015), warna yang dihasilkan dari seduhan teh memiliki korelasi terhadap kandungan metabolitnya. Pengukuran warna dapat dilakukan menggunakan alat *chromameter* dengan prinsip menangkap cahaya yang terpantulkan dari bahan. Analisa warna disajikan dalam parameter L, (a), (b), dimana L (*Lightness*) menggambarkan kepekatan warna bahan dengan nilai indikator 0-100. Parameter (a) menggambarkan warna merah-hijau, nilai indikator 0 hingga +100 menunjukkan warna merah sedangkan nilai 0 hingga -80 menunjukkan warna hijau. Parameter (b) menggambarkan warna kuning-biru, nilai indikator 0 hingga +70 menunjukkan warna kuning, sedangkan nilai 0 hingga -70 menunjukkan warna biru (Arumsari *et.al.*, 2019).

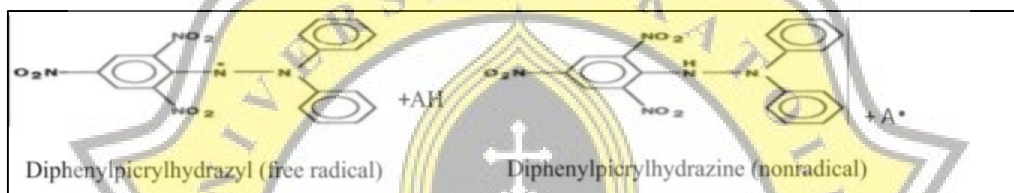
Pengujian aktivitas antioksidan banyak jenisnya, tetapi kebanyakan uji memiliki prinsip uji yang sama yaitu reduksi. Hal ini sesuai dengan (Baek *et al.*, 2015), yang menyatakan suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan jika memiliki daya reduksi dengan mendonorkan atom hidrogen atau elektronnya terhadap senyawa radikal. Menurut Badarinath *et al.*, (2010), terdapat 3 golongan pengujian aktivitas antioksidan, yaitu golongan pertama dengan prinsip *Hydrogen Atom Transfer Methods* (HAT), seperti *Lipid Peroxidation Inhibition Capacity Assay* (LPIC/ missal FTC) dan *Oxygen Radical Absorbance Capacity Method* (ORAC). Golongan kedua dengan prinsip *Electron Transfer Methods* (ET), misal 2,2- *diphenyl-1- picrylhydrazil* (DPPH) *Free Radical Scavenging Assay* dan *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Adapun yang termasuk golongan ketiga adalah metode seperti *Chemiluminescence*, *Total Oxidant Scavenging Capacity* (TOSC) dan *Total Antioxidant Activity*.

Penggunaan pengujian metode aktivitas antioksidan yang berbeda, berguna untuk mengetahui profil senyawa antioksidan dominan dalam bahan. Menurut Zhang dan Yi-Ming (2008) pengujian aktivitas antioksidan menggunakan FRAP efektif bagi bahan yang mengandung banyak senyawa tanin. Penggunaan metode TAA, efektif untuk mengetahui aktivitas antioksidan senyawa flavonoid, seperti fenol (Salamah dan Liani, 2014). Penggunaan metode DPPH *scavenging activity* sering digunakan untuk mengetahui

aktivitas seyawa antioksidan secara umum karena relatif stabil untuk menentukan aktivitas antioksidan pada berbagai macam ekstrak tanaman (Zhang dan Yi-Ming, 2008).

1.2.2.1 DPPH Scavenging Activity

Metode pengujian antioksidan yang paling sering digunakan karena sensitif dan mudah adalah dengan melihat aktivitas reduksi 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). DPPH sebagai radikal bebas akan membentuk kompleks warna violet gelap ketika dilarutkan dengan ethanol yang disebabkan delokalisasi elektron bebasnya. Proses reduksi antioksidan dapat terlihat ketika larutan DPPH dicampurkan dengan substrat pendonor atom hidrogen, yang ditunjukkan dengan memudarnya warna violet (Alam *et.al*, 2013)



Gambar 3. Reaksi perubahan DPPH radikal menjadi non-radikal
(Sumber : Alam *et.al*, 2013)

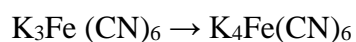
Untuk mengetahui potensi antioksidan, dapat dilihat perubahan densitas optik dari DPPH menggunakan spektrofotometer. Dalam operasi teknisnya, ekstrak sampel diambil sebanyak 0,2 mL dan diencerkan menggunakan methanol dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH (0,5mM). Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit, dan diukur absorbansinya menggunakan panjang gelombang 517nm. Persentase reduksi dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut,

$$Q = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

1.2.2.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Metode ini banyak digunakan untuk mengetahui total antioksidan yang dimiliki suatu bahan untuk mereduksi radikal bebas. Metode FRAP banyak digunakan karena cepat dan mudah dalam persiapannya dan hampir sama efektifnya dengan DPPH. Prinsip metode ini adalah mengukur kemampuan antioksidan untuk mereduksi Fe^{3+} . Pengukuran ini

didasarkan pada reduksi Fe^{3+} dan *2,3,5-triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diene chloride* (TPTZ) pada pH rendah. Proses reduksi ini dapat diamati menggunakan spektrofotometer untuk melihat perubahan yang terjadi. Dalam operasi teknisnya 3 mL reagen FRAP disiapkan dan dicampur dengan 100 μL sampel encer, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 593 nm (Alam *et.al*, 2013). Reaksi reduksi Fe^{3+} terhadap antioksidan dapat dilihat sebagai berikut :



1.2.2.3 Total Antioxidant Activity (TAA)

Metode ini sering digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan dalam suatu bahan dengan melihat terbentuknya kompleks *phosphomolydenum*. Prinsip pengukuran ini adalah reduksi Mo (VI) menjadi Mo (V) pada sampel yang akan membentuk kompleks warna hijau fosfat Mo (V) pada pH asam. Dalam operasi teknisnya 0,1mL sampel dicampurkan dengan 1 mL reagen molibdat yang terdiri dari (0,6 M asam sulfat, 28mM sodium fosfat, 4mM ammonium molybdate). Kemudian ditutup dan dipanaskan dalam *waterbath* selama 90 menit dengan suhu 95°C. Kemudian didinginkan hingga suhu ruang dan dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 695 nm. Semakin pekat warna hijau yang terbentuk maka, semakin besar pula senyawa fenolik yang dapat mereduksi Mo (VI) menjadi Mo (V) (Alam *et.al*, 2013).

1.2.3 Proses Pengolahan dan Penyajian Minuman Herbal

Dalam konsumsi minuman herbal tradisional, belum ada tahapan proses yang baku dan terstandarisasi dalam preparasi konsumsinya. Proses konsumsi yang dilakukan biasanya bervariasi tergantung dari manfaat/klaim kesehatan dari tanaman herbal yang akan dikonsumsi. Metode konsumsi minuman herbal menurut Nafiu *et al.* (2017) dapat dilakukan dengan metode seduhan, rebusan, maserasi dan *tinctures*.

Metode seduhan dilakukan dengan melakukan perendaman bahan dalam air panas bersuhu 80°C selama 10 menit (Papoti *et al.*,2019). Kemudian larutan disaring dan dapat langsung dikonsumsi. Pada metode ini dianjurkan untuk tidak menyimpan ramuan lebih

dari satu hari. Dalam metode seduhan dapat digunakan bahan segar maupun kering (Nafiu *et al.* 2017).

Metode rebusan, dapat dilakukan dengan merebus bahan dalam air mendidih selama 15-20 menit atau sampai volume air berkurang setengahnya. Keuntungan metode rebusan ini adalah ramuan dapat disimpan dalam waktu 2-3 hari di dalam suhu kulkas. Metode rebusan dibagi menjadi 2 yaitu rebusan kering dan rebusan kuat. Rebusan kuat dilakukan untuk bahan herbal dengan tekstur yang keras, seperti akar dan batang. Proses perebusan ini dapat dilanjutkan dengan proses perendaman bahan di dalam larutan selama 1 malam, untuk bahan dengan tekstur yang keras dan berukuran besar, seperti batang dan akar. Sedangkan perebusan kering memiliki prinsip kerja yang sama tetapi proses ini dapat diikuti dengan proses pengeringan menggunakan *spray dryer* untuk menghasilkan bentuk bubuk untuk memudahkan penyimpanan (Nafiu *et al.*, 2017).

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui profil stabilitas aktivitas antioksidan dan kandungan fenolik pada perbedaan penyajian minuman herbal daun pegagan menggunakan metode perebusan dan penyeduhan dengan dengan waktu yang berbeda.

