

4. PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan menggunakan daun pegagan dengan nama latin *Centella asiatica* segar yang dikeringkan. Tanaman pegagan telah ditetapkan sebagai tanaman yang dapat digunakan untuk obat tradisional sejak tahun 1884 (Winarto & Surbakti, 2003). Berdasarkan BPOM RI (2010), juga memaparkan bahwa daun pegagan memiliki manfaat sebagai antioksidan sekaligus antibakteri, yang dapat meningkatkan aktivitas memori, mengatasi radang, memberi efek menenangkan, serta meningkatkan fungsi mental menjadi lebih baik (BPOM RI, 2010).

Penelitian ini diawali dengan *pre-treatment* yaitu dengan mengeringkan daun pegagan, dengan cara : daun pegagan dipotong kecil-kecil tujuannya yaitu untuk memperbesar luas permukaan, selanjutnya direndam CaCl_2 0,5% selama 15 menit, lalu di *steam blanching* selama 3 menit dan diangin-anginkan selama 5 menit. Selanjutnya, dikeringkan menggunakan *oven binder* dengan suhu 50°C, 55°C, dan 60°C hingga kadar air <8% untuk memenuhi syarat mutu SNI 2013. CaCl_2 0,5% atau kalsium klorida 0,5% merupakan salah satu bahan pengeras untuk sayur atau buah. Kalsium klorida termasuk bahan pengeras atau *firming agent* untuk buah dan sayuran. Garam kalsium klorida merupakan elektrolit kuat sehingga mudah larut dalam air dan ion-ion Ca mudah terabsorpsi ke dalam jaringan yang mengakibatkan dinding sel semakin kuat (Daniawan dkk., 2014). Sebelum dikeringkan dilakukan *steam blanching*, tujuannya agar dapat mengurangi efek negatif selama pengeringan, seperti mematikan enzim penyebab reaksi *browning* dan dapat mempersingkat waktu pengeringan (Lukito, 2017).

Selanjutnya yaitu proses penyeduhan dilakukan menggunakan pelarut air dengan suhu 90°C pada daun pegagan kering sebanyak 0,5 gram. Kemudian, diamkan selama waktu yang sudah ditentukan, yaitu (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, dan 24) menit. Selanjutnya, hasil seduhan minuman herbal digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, total fenolik, dan warna.

4.1. Pengujian Antioksidan dengan Pereaksi *2,2-diphenyl-1-pikrilhidrazil* (DPPH) pada Minuman Herbal Daun Pegagan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh, tubuh tidak mempunyai sistem pertahanan antioksidatif yang berlebihan, jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh akan membutuhkan antioksidan eksogen seperti vitamin E dan vitamin C (Rohman & Riyanto, 2005). Salah satu pengujian yang sudah umum digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada suatu bahan yaitu dengan mengetahui aktivitas reduksi terhadap suatu senyawa radikal bebas. DPPH merupakan suatu senyawa radikal bebas yang bersifat stabil sehingga jika digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan dengan metanol dan bila disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik dan stabil selama bertahun-tahun. Prinsip dari pengujian DPPH ini yaitu dengan mereaksikan suatu senyawa antioksidan dengan senyawa radikal bebas. Metode DPPH menggunakan alat yang bernama spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur nilai absorbansi sampel yang digunakan (Rahmawati dkk., 2015). Selain itu Rahmawati dkk., (2015), juga memaparkan bahwa metode DPPH adalah metode yang dapat digunakan sebagai penentu aktivitas antioksidan dalam sampel yang akan diujikan dengan melihat kemampuannya dalam menangkal radikal bebas pada DPPH. Kelebihan pada metode DPPH ini yaitu metodenya yang sangat sederhana, mudah, cepat, peka, serta tidak membutuhkan sampel yang banyak. Mudah diterapkan karena senyawa radikal DPPH yang digunakan bersifat relatif stabil dibanding metode lainnya.

Pertama yang dilakukan yaitu sampel diambil sebanyak 0,2 mL dan ditambahkan dengan 3,8 mL DPPH. Selanjutnya untuk pembuatan blanko dengan diambil 0,2 mL dan ditambahkan dengan 3,8 mL DPPH. Kemudian, larutan didiamkan selama 30 menit pada ruang gelap yang bertujuan untuk menghindari larutan DPPH terpapar oleh cahaya dan juga tabung ditutup menggunakan *aluminium foil*. Hal tersebut dilakukan sesuai dengan Alam, dkk., (2013), yang menyatakan bahwa DPPH sensitif terhadap cahaya serta dapat mengurangi keakuratan proses pemeriksaan aktivitas reduksi, selain itu untuk memberi waktu agar senyawa antioksidan dapat bereaksi didalam sampel untuk mereduksi senyawa radikal DPPH. Setelah 30 menit maka warna pada larutan akan berubah

selanjutnya diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm. Ketika larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan bahan pendonor elektron maka DPPH akan tereduksi, menyebabkan warna ungu akan memudar dan digantikan warna kuning yang berasal dari gugus pikril (Tristantini, dkk., 2016)

Berdasarkan Tabel 1., dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara waktu dan proses preparasi pada minuman herbal daun pegagan. Perbedaan suhu dan waktu pada proses pengolahan daun herbal pegagan dapat mengubah kandungan senyawa antioksidannya (Puspita dan Desrita, 2018). Perbedaan ini dapat disebabkan karena suhu dan waktu yang digunakan dalam proses preparasi yang berbeda. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan suhu optimal pengeringan daun pegagan yaitu pada suhu 50°C. Hal ini sesuai dengan Yulianti dkk., (2019), aktivitas antioksidan daun pegagan pada perlakuan suhu 50°C menghasilkan aktivitas antioksidan yang tergolong sangat kuat. Suhu dan lama waktu pengeringan dapat mempengaruhi kandungan senyawa aktif dalam bahan. Semakin lama waktu pengeringan, maka aktivitas antioksidannya semakin lemah. Hal ini sejalan dengan penelitian Angraiyati dan Hamzah (2017), bahwa semakin lama waktu pengeringan maka aktivitas antioksidan daun minuman herbal semakin menurun karena sebagian senyawa akan hilang dengan panas. Proses pengolahan seperti pengeringan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap uji kapasitas antioksidan. Proses pengeringan sendiri akan membantu keluarnya kandungan senyawa di dalam daun pegagan. Aktivitas antioksidan tertinggi yaitu pada suhu 50°C. Pada Gambar 3., dapat dilihat bahwa aktivitas antioksidan mengalami kenaikan dari waktu 0,5 menit hingga waktu 15 menit dan akan mengalami penurunan pada waktu 18 menit hingga waktu 24 menit. Waktu penyeduhan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan pada minuman herbal dimana waktu yang terlalu singkat menjadi kurang efisien karena kandungan belum larut secara optimal dan belum mencapai titik yang optimal (Nindyasari, 2012). Pada penelitian ini, aktivitas antioksidan dalam minuman herbal daun pegagan membutuhkan waktu 15 menit penyeduhan untuk mendapatkan aktivitas antioksidan yang paling optimal. Penurunan aktivitas antioksidan terjadi pada 18 menit karena aktivitas antioksidan menurun disebabkan oleh komponen-komponen penyusun antioksidan mengalami kerusakan sehingga dapat menurunkan tingkat aktivitasnya (Khatulistiwa, dkk, 2020)

4.2. Pengujian Kandungan Fenolik pada Minuman Herbal Daun Pegagan

Polifenol adalah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibanding dengan vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dari pada vitamin E (Yusni, dkk., 2015). Manfaat lain dari polifenol bagi kesehatan sendiri yaitu dapat mencegah atau juga dapat mengobati penyakit kronis seperti kanker, penyumbatan pembuluh darah dan juga diabetes (Mahesa, 2012). Penelitian ini menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* dan menggunakan asam galat sebagai larutan standarnya. Senyawa fenolik terutama polifenol bersifat antioksidan karena dapat mengadakan reaksi reduksi-oksidasi yang memungkinkan menjadi agen pereduksi, donor hidrogen, peredam oksigen singlet, dan pengkelat logam (Rachmatiah, dkk., 2015). Senyawa fenolat merupakan dalam metabolit sekunder dari tanaman yang memiliki aktivitas biologi serta terdiri dari 8.000 macam senyawa.

Penelitian dilakukan dengan mengambil masing-masing sampel seduhan daun pegagan sebanyak 0,4 mL ditambah dengan 3,6 mL larutan Folin dan 3,6 mL larutan natrium karbonat. Di *vortex* selama 30 detik, larutan dimasukkan ke spektrofotometer UV-Vis dengan Panjang gelombang 760 nm untuk mengetahui nilai absorbansinya. Pengujian total fenolik menggunakan asam galat sebagai larutan standar. Nilai absorbansi yang didapatkan dari pengukuran absorbansi larutan standar asam galat kemudian dimasukkan dalam program *excel* untuk dibuat kurva baku agar didapatkan persamaan regresi pada asam galat. Sedangkan nilai absorbansi dari sampel akan dimasukkan dalam persamaan asam galat $y = a + bx$ yang mana telah diperoleh persamaan regresi asam galat yaitu $y = 0,0034x + 0,0083$ dengan nilai $R^2 = 0,9906$.

Berdasarkan Tabel 3., dapat dilihat bahwa adanya perbedaannya nyata ($p < 0,05$) antara suhu pengeringan dan lama penyeduhan terhadap kandungan total fenol minuman herbal daun pegagan. Hal ini disebabkan karena suhu dan juga waktu penyeduhan yang digunakan berbeda dan memiliki rentang waktu 3 menit. Kandungan polifenol tertinggi pada daun kering pegagan yaitu sebesar 17,424 mg/L dengan waktu penyeduhan 15 menit menggunakan suhu 50°C, sedangkan yang terendah yaitu 7,464 mg/L dengan waktu penyeduhan 0,5 menit menggunakan suhu 55°C. Pada Gambar 4., dapat dilihat

peningkatan dan penurunan kandungan polifenol selama masa penyeduhan dengan waktu yang berbeda-beda. Kandungan polifenol yang paling optimal yaitu daun pegagan kering dengan suhu 50°C. Hal tersebut sesuai dengan dengan Yulianti dkk., (2019), bahwa kandungan polifenol yang paling optimal terjadi pada suhu 50°C. Suhu dan lama waktu pengeringan dapat mempengaruhi kandungan senyawa aktif dalam sampel. Pengeringan daun pegagan menggunakan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan vitamin yang terdapat pada daun pegagan tersebut dapat rusak atau hilang karena panas yang terlalu tinggi. Penggunaan suhu tinggi pada pembuatan minuman herbal dapat meningkatkan pelepasan senyawa fenolik pada dinding sel (Dewata dkk., 2017). Hal ini disebabkan karena waktu kontak dengan suhu yang terlalu tinggi sehingga dapat merusak senyawa yang sudah terekstrak. Hal ini, sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan yang terdapat pada Gambar 4., yaitu pada menit 0,5 hingga menit 15 mengalami kenaikan, lalu pada menit 18 hingga menit 24 mengalami penurunan karena kontak yang terlalu lama. Dewata (2017), yang memaparkan bahwa waktu penyeduhan yang terlalu lama juga menjadi salah satu alasan turunnya kandungan fenolik karena waktu yang lama menyebabkan kandungan fenol dalam komponen sel hancur sehingga ekstraksi akan menjadi lebih sulit. Menurut Haras, dkk., (2017), yang memaparkan bahwa semakin lama waktu penyeduhan maka semakin banyak kandungan total fenol yang terekstrak akan menyebabkan warna orange kecoklatan semakin pekat, maka semakin lama penyeduhan maka kesempatan kontak antara air penyeduh dengan teh semakin lama sehingga semakin lama kandungan sel yang ada pada teh akan hancur.

Peningkatan kandungan total fenolik berbanding lurus dengan dengan aktivitas antioksidan terbukti dengan semakin tinggi suhu yang digunakan kandungan polifenol dan aktivitas antioksidan mengalami penurunan, karena waktu optimal daun pegagan kering yaitu pada suhu 50°C. Pernyataan tersebut sesuai dengan Tabel 8., bahwa hubungan korelasi total fenolik dan antioksidan sangat kuat.

4.3. Energi Aktivasi Antioksidan dan Total Fenolik Minuman Herbal Daun Pegagan

Ea adalah energi aktivasi yaitu energi yang diperlukan pada faktor A untuk mendegradasi produk. Salam, (2015), memaparkan bahwa hubungan energi aktivasi dengan laju reaksi adalah berbanding terbalik, dimana semakin besar energi aktivasi maka laju reaksinya semakin lambat karena energi minimum untuk terjadi reaksi semakin besar, selain itu semakin kecil harga $\ln k$ maka harga $1/T$ rata-rata semakin besar. Agar dapat mengetahui energi aktivasi suatu sampel, maka harus menggunakan model *Arrhenius* yaitu hubungan yang paling umum untuk pengaruh suhu pada laju kerusakan mutu makanan.

Persamaan untuk model *Arrhenius* yaitu :

$$k = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Keterangan :

- k : konstanta kecepatan reaksi
- k_0 : frekuensi reaksi factor (factor *Arrhenius*)
- E_a : energi aktivasi (kJ/mol)
- R : konstanta gas ideal (1,986 / K.mol)
- T : suhu (K)

Persamaan regresi linier antara $1/T$ (1/K) dengan $\ln k$ dapat diketahui besarnya nilai energi aktivasi (E_a) penurunan atau peningkatan nilai aktivitas antioksidan dan total fenolik. Berdasarkan Tabel 7., dapat dilihat energi aktivasi yang dibutuhkan pada antioksidan dan polifenol. Energi aktivasi memiliki hubungan yang terbalik dengan laju reaksi (Ardyagarini dkk., 2015). Menurut Damunir (2007), ada beberapa faktor yang mempengaruhi besarnya energi aktivasi minimum pada reaksi, antara lain yaitu suhu, waktu reaksi dan konsentrasi reaktan, selain itu besarnya energi aktivasi minimum pada setiap perubahan suhu akan mempengaruhi harga konstanta laju reaksi. Pada Gambar 8 dan 9, dapat dilihat bahwa semakin tinggi suhu reaksi maka akan mengalami peningkatan. Hal tersebut sesuai dengan Suleman (2017), terjadi karena dengan naiknya suhu, maka tumbukan antar partikel semakin besar, sehingga reaksi berjalan semakin cepat dan konstanta reaksi semakin besar. Suleman (2017), juga memaparkan bahwa peningkatan

laju reaksi ini disebabkan oleh meningkatnya konstanta laju reaksi yang merupakan fungsi dari suhu yaitu semakin tinggi suhu, maka semakin besar konstanta laju reaksinya.

4.4. Intensitas Warna Minuman Herbal Daun Pegagan

Warna dapat dijadikan sebagai patokan atau tolak ukur konsumen dalam menilai suatu produk makanan atau minuman, karena warna merupakan sesuatu yang dapat dilihat oleh mata telanjang. Uji analisis warna menggunakan alat *chromameter*, alat sebelum digunakan untuk menguji harus dikalibrasi dahulu dengan menggunakan plat berwarna putih. Selanjutnya, dapat ditembakkan ke arah gelas sloki yang sudah berisi sampel minuman herbal. Tunggu hingga nilai L, nilai a*, dan b* muncul. Nilai L ini menunjukkan tingkat kecerahan dari suatu produk, jika nilai L semakin tinggi maka suatu produk tersebut semakin terang. Nilai L ini menunjukkan tingkat kecerahan dari suatu sampel, jika nilai L semakin tinggi maka suatu sampel tersebut semakin terang. Hal ini dinyatakan oleh Wibawanti & Rinawidiastuti (2018), bahwa nilai *lightness* dinyatakan dalam 0-100, dimana 0 menunjukkan warna hitam yang artinya gelap, sedangkan nilai 100 menunjukkan warna putih yang artinya terang. Rahmayati, dkk (2014), memaparkan bahwa nilai +a* menunjukkan warna kemerahan sedangkan -a* menunjukkan warna kehijauan. Nilai b* menunjukkan warna kekuningan sedangkan -b* menunjukkan warna kebiruan.

Berdasarkan Tabel 5., dapat dilihat adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$) antara suhu pengeringan dan lama waktu penyeduhan terhadap nilai L, a*, dan b* minuman herbal daun pegagan. Nilai *Lightness* yang paling tinggi yaitu 16,529 dengan suhu 50°C menggunakan waktu penyeduhan 0,5 menit, sedangkan yang paling rendah yaitu 11,006 dengan suhu 60°C menggunakan waktu penyeduhan 24 menit. Dapat dilihat pada Gambar 5., bahwa semakin lama waktu penyeduhan maka semakin mengalami penurunan. Hal tersebut sesuai dengan yang dinyatakan oleh Wibawanti & Rinawidiastuti (2018), bahwa nilai *lightness* dinyatakan dalam 0-100, dimana 0 menunjukkan warna hitam atau gelap, sedangkan nilai 100 menunjukkan warna putih atau terang, warna suatu sampel akan semakin gelap bila nilai L semakin menurun atau rendah. Pada menit 0,5 mendapatkan

nilai yang paling tinggi karena pada menit 0,5 warna dari daun pegagan belum keluar karena waktu yang terlalu singkat. Berdasarkan Gambar 10., dapat dilihat bahwa adanya korelasi yang sangat lemah antara warna L dengan antioksidan dan polifenol. Hal tersebut, dikarenakan pada saat proses pengeringan, semakin lama waktu pengeringan dan semakin tinggi suhu pengeringan, maka akan semakin banyak pigmen dari suatu bahan yang berubah. Pada proses pengeringan dapat menyebabkan warna hijau klorofil pada daun teroksidasi menjadi coklat. Hal ini dikarenakan terjadi peristiwa pencoklatan (Hernani, 2004).

Pada Tabel 5., dapat dilihat nilai a^* yang tinggi yaitu 3,308 dengan suhu 50°C menggunakan waktu penyeduhan 18 menit, sedangkan nilai terendah yaitu 0,522 dengan suhu 55°C dan waktu penyeduhan 0,5 menit. Pada Gambar 6., dapat dilihat bahwa nilai a^* mengalami peningkatan pada titik tertentu yaitu pada menit 15 pada suhu 55°C dan 60°C, sedangkan pada suhu 50°C titik tertinggi yaitu pada menit ke 18. Setelah mencapai titik tertinggi maka akan mengalami penurunan. Saat proses pelayuan daun hijau, maka Mg akan terlepas dari struktur klorofil dan akan membentuk feofitin menjadi tahap pertama degradasi klorofil, baru diikuti oleh lepasnya gugus fitol (Eckardt, 2009). Menurut Udiarta, dkk., (2015), klorofil sangat mudah terdegradasi dengan adanya pembentukan feofitin karena pengaruh lingkungan (panas, cahaya, oksigen, dan kondisi asam) menjadi senyawa-senyawa turunannya yang tidak lagi berwarna hijau.

Pada Tabel 5., dapat dilihat nilai b^* yang paling tinggi yaitu 8,612 pada suhu 50°C dengan waktu penyeduhan 15 menit, dan nilai yang paling rendah yaitu 0,939 pada suhu 55°C dengan waktu penyeduhan 0,5 menit. Pada Gambar 7., dapat dilihat bahwa grafik mengalami kenaikan dari menit 0,5 hingga menit 15 dan mengalami penurunan pada menit 18 hingga menit 24. Hal ini sesuai dengan teori Anggraini dkk, (2014), pembentukan warna kuning pada minuman daun pegagan diduga karena pengaruh senyawa *quercetin* yang merupakan turunan dari senyawa flavonoid yang menyumbang pembentukan warna kuning pada minuman daun pegagan. Hal ini sesuai dengan pengamatan, dimana warna dari minuman herbal daun pegagan berwarna hijau kekuningan dengan intensitas warna yang berbeda beda tiap perlakuannya. Selain itu,

warna kuning yang dihasilkan oleh minuman herbal daun pegagan karena adanya kandungan pigmen flavonoid dan senyawa tanin menjadi theaflavin (Towaha, 2013).

4.5. Rekomendasi Konsumsi dan Fungsi Kesehatan Minuman Daun Pegagan

Tumbuhan pegagan mengandung banyak memiliki manfaat sebagai antioksidan sekaligus antibakteri, meningkatkan aktivitas memori, mengatasi radang, memberi efek menenangkan dan meningkatkan fungsi mental menjadi lebih baik (BPOM RI, 2010). Tanaman pegagan telah ditetapkan sebagai tanaman yang dapat digunakan untuk obat tradisional sejak tahun 1884 (Winarto & Surbakti, 2003). Berdasarkan dengan analisa aktivitas antioksidan dan kandungan polifenol terhadap minuman herbal daun pegagan yang telah dilakukan sebagai penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan yang tinggi dan total fenol yang tinggi juga. Hal tersebut, sesuai dengan Ibrahim, dkk., (2015), pada perlakuan suhu yang tinggi di awal dapat mempercepat proses kelarutan senyawa metabolit, tapi penggunaan suhu tinggi dengan rentang waktu yang lama akan merusak senyawa metabolit yang tidak tahan suhu tinggi.

Tumbuhan pegagan memiliki kandungan bioaktif, beberapa komponen bioaktif dalam tanaman pegagan adalah asiatikosida, madekasosida, brahmosida, brahminosida, asam brahmik, asam madasiatik, meso-inositol, sentelosida, karotenoid, hidrokotilin, vellarin, tanin serta garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium, dan besi, fosfor, minyak atsiri (1%), pektin (17.25%), dan zat pahit vellarine, dan zat samak (Dalimartha, 2008). Pegagan juga mengandung komponen yang bermanfaat bagi kesehatan, bahan utama yang dikandung pegagan adalah steroid yaitu triterpen glikosida. Komponen dari triterpen yang meliputi : asiatikosida dan madecassoside yang memiliki fungsi meningkatkan perbaikan dan penguatan sel di dalam tubuh manusia. Tumbuhan yang berkhasiat anti tumor dapat juga digunakan sebagai antifertilitas. Senyawa asiatikosida merupakan senyawa bioaktif yang bersifat polar (Winarto dan Surbakti, 2003). Senyawa tersebut dapat bermanfaat untuk tubuh manusia karena pada daun pegagan berkhasiat sebagai anti infeksi, anti racun, penurunan panas, anti demensia, anti sifilis, peluruhan air seni, dan anti lepra.