



Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan
Universitas Sebelas Maret

Available online at
www.ilmupangan.fp.uns.ac.id

**JURNAL
TEKNOSAINS
PANGAN**

Jurnal Teknosains Pangan Vol IV No. 4 Oktober 2015

PENGARUH SUHU TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBIA EKSTRAK BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DENGAN PELARUT ETANOL DAN AIR

*Effects of Temperatures on Antioxidant and Antimicrobia Activity of Melinjo Seed (*Gnetum gnemon* L.) with Ethanol and Water as Solvent*

Adi Wisnu Soehendro^{*)}, Godras Jati Manuhara^{*)}, Edhi Nurhartadi^{*)}

^{*)} *Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, UNS, Surakarta*

Received 30 Juni 2015; accepted 15 Agustus 2015 ; published online 1 Oktober 2015

ABSTRAK

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tanaman yang banyak terdapat di daerah Asia Tenggara termasuk Indonesia. Berdasarkan data BPS (Badan Pusat Statistik) tahun 2013, rata-rata produksi melinjo di Indonesia adalah 220.086 ton. Hingga saat ini, terutama bagian biji tanaman, hanya dikonsumsi setelah diolah menjadi emping. Baru-baru ini, beberapa penelitian menyebutkan bahwa ekstrak biji melinjo memiliki aktivitas antioksidan dan antimikrobia. Untuk mendapatkan ekstrak dari biji melinjo, banyak faktor eksternal yang mempengaruhi, beberapa di antaranya adalah pemilihan suhu ekstraksi dan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Penelitian mengenai efek kesehatan dari ekstrak biji melinjo, susunan protein, dan juga aktivitas antioksidan dan antimikrobianya telah dilakukan. Walaupun begitu, masih belum ada perbandingan total fenol, aktivitas antioksidan dan antimikrobia ekstrak biji melinjo pada suhu ekstraksi dan pelarut yang berbeda.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari variasi suhu dan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi pada total fenol, aktivitas antioksidan dan antimikrobia ekstrak biji melinjo. Terdapat tiga tahap pada penelitian ini, tahap pertama adalah pembubukan biji melinjo melalui pengeringan, pengecilan ukuran dan pengayakan untuk mendapatkan bubuk biji melinjo. Tahap kedua adalah ekstraksi biji melinjo, bubuk biji melinjo direndam dalam pelarut (etanol dan air) pada suhu yang telah ditentukan (45, 60, dan 75°C), tahap ini dilakukan dua kali untuk setiap sampel. Tahap terakhir adalah analisis total fenol (Folin-Ciocalteu), aktivitas antioksidan (DPPH dan *Reducing Power*) dan antimikrobia (*Well-diffusion*) ekstrak biji melinjo yang dihasilkan, analisis untuk setiap sampel dilakukan dua kali.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu ekstraksi yang digunakan, total fenol, aktivitas antioksidan, dan antimikrobia ekstrak biji melinjo semakin tinggi. Selain itu, pelarut etanol menunjukkan kinerja yang lebih baik apabila dibandingkan dengan pelarut air terutama pada analisis aktivitas antimikrobia dimana pelarut air tidak menunjukkan aktivitas apapun. Perlakuan terbaik adalah ekstrak yang menggunakan suhu ekstraksi 75°C dan pelarut etanol.

Kata kunci: Ekstraksi, Biji Melinjo, Suhu, Pelarut Etanol, Pelarut Air, Aktivitas Antioksidan, Aktivitas Antimikrobia

ABSTRACT

*Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) is easily found in Southeast Asia especially at Indonesia. According to BPS (Badan Pusat Statistik) record from 2013, the average production of melinjo in Indonesia is 220.086 tons. The seed of this plant is consumed as "emping", a widely popular snacks in Indonesia. Recently, some research stated that melinjo seed extract have antioxidant and antimicrobia activity. To acquire a melinjo seed extract with good quality, the extraction temperatures and solvents need to be selected carefully. Research about the health effects, protein structures, and antioxidant and antimicrobia activity of melinjo seed has been done.*

However, as to our knowledge, a research about the effects of varied extraction temperatures and solvents on total phenols, antioxidant and antimicrobia activity of melinjo seed extract is yet to be determined.

The aim from this research is to determine the effects of varied temperatures and solvent used in the extraction of melinjo seed on total phenols, antioxidant and antimicrobia activity of the extracts. This research was divided into three steps. First, the powdering of melinjo seed through drying, size reducing, and sieving. Second, the powdered melinjo seed was submerged inside the solvent (ethanol and water) at the predetermined temperatures (45, 60, and 75°C), this step was done twice. The last part was analysis of total phenols (Folin-Ciocalteu), antioxidant (DPPH and Reducing Power) and antimicrobia (Well-diffusion) activity, every sample was examined two times.

The results from this research indicate that the increase of extraction temperatures causing total phenols, antioxidant and antimicrobia activity of melinjo seed extract increasing as well. Furthermore, ethanol as solvent showed a much better result than water, especially when melinjo seed extracted with water didn't exhibit any antimicrobia activity. Melinjo seed extracted at 75°C with ethanol give the best result in this research.

Keyword: Extraction, Melinjo Seed, Temperatures, Solvent, Ethanol, Water, Antioxidant Activity, Antimicrobia Activity

*)Corresponding author: adi_wsn@yahoo.com

PENDAHULUAN

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tanaman yang banyak terdapat di daerah Asia Tenggara termasuk Indonesia. Berdasarkan data BPS (Badan Pusat Statistik) tahun 2013, rata-rata produksi melinjo di Indonesia pada tahun 2003 hingga 2013 adalah 220.086 ton. Oleh masyarakat Indonesia, kulit biji dan biji dari tanaman ini dikonsumsi setelah diolah menjadi sayur (kulit biji) dan emping (biji). Buah melinjo yang sudah tua merupakan bahan baku emping melinjo yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan mudah memasarkannya (Sunanto, 1991). Ekstrak biji melinjo mengandung 6 macam senyawa stilbenoid, yaitu *trans*-resveratrol (3,5,4'-*tryhydroxy-trans-stilbene*), *gnetin* C, *gnetin* L, *gnemonoside* A, *gnemonoside* C, dan *gnemonoside* D (Kato *et al.*, 2009).

Pada Tani *et al.* (2014), disebutkan bahwa ekstrak biji melinjo menunjukkan aktivitas farmakologikal seperti aktivitas antimikrobia, penghambatan lipase dan amilase, modulasi dari produksi sitokin, antiangiogenesis, antimetabolik sindrom dan pencegahan penuaan endotelial. Selain itu, resveratrol dan turunannya diketahui memiliki aktivitas biologis termasuk aktivitas antioksidan, penghambatan tirosinase, dan biosintesis melanin.

Setiap tanaman memiliki karakteristik unik, sehingga setiap tanaman membutuhkan kondisi ekstraksi yang berbeda untuk mendapatkan senyawa fenolik dengan maksimal. Keberadaan fenol dalam jumlah yang cukup pada hasil ekstrak perlu

diketahui karena senyawa ini merupakan antioksidan alami dan mampu mereduksi kerusakan oksidatif akibat dari penyakit degeneratif seperti kanker, arterosklerosis atau penyakit kardiovaskular (Bhat dan Nabilah, 2014). Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi antara lain jenis pelarut, konsentrasi pelarut, ukuran partikel, suhu, pH dan lama ekstraksi (Chew *et al.*, 2011). Dari sekian banyak faktor tersebut, penelitian ini berfokus pada pengaruh suhu dan pelarut terhadap total fenol, aktivitas antioksidan dan antimikrobia dari ekstrak biji melinjo.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam proses ekstraksi dan analisis ekstrak biji melinjo antara lain *cabinet dryer*, mesin penggiling, mesin pengayak, timbangan 5 kg, blender, erlenmeyer, gelas beker, soxhlet, *magnetic stirrer*, *hotplate*, kertas saring, *aluminium foil*, *vacuum pump*, dan botol gelap. Alat-alat tambahan yang digunakan untuk analisis antara lain:

- Analisis Total Fenol dan Antioksidan : spektrofotometer, tabung reaksi, kuvet, mikro pipet, dan vortex.
- Analisis Aktivitas Antimikrobia : cawan petri, jangka sorong, borer, inkubator, dan mikro pipet.

Bahan

Biji melinjo didapatkan dari produsen emping di Kartasura. Proses ekstraksi menggunakan

etanol 50% dan aquades. Bahan-bahan yang digunakan untuk menganalisis antara lain:

- Analisis Total Fenol : aquades, Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 , dan asam galat.
- Analisis Aktivitas Antioksidan : metanol, DPPH, buffer fosfat, potasium ferisianida ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), asam trikloroasetat, aquades, asam askorbat dan klorat besi.
- Analisis Aktivitas Antimikrobia : Nutrien Broth (NB), Nutrien Agar (NA), *Bacillus cereus* FNCC 0057 (Gram-positif) dan *Escherichia coli* FNCC 0091 (Gram-negatif).

Tahapan Penelitian

Pengeringan dan pengecilan ukuran biji melinjo. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan *cabinet dryer* pada suhu 80°C selama 24 jam. Biji melinjo yang telah kering, diblender dan diayak (35 mesh) untuk mendapatkan biji melinjo dalam bentuk bubuk.

Ekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan metode yang digunakan oleh Parhusip dan Sitanggang (2011). Bubuk biji melinjo direndam dalam pelarut (etanol dan air) dengan perbandingan antara sampel dan pelarut sebesar 1:4 selama 24 jam pada suhu 45, 60, dan 75°C dan dengan rotasi 150 rpm. Proses ini dilakukan dengan menggunakan *hotplate*. Hasil ekstraksi kemudian disaring dengan bantuan *vacuum pump* dan kertas saring. Filtrat kemudian disimpan dalam botol gelap di suhu 4°C .

Analisis total fenol. Analisis total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu seperti pada penelitian oleh Bhat dan Nabilah (2014) dan Tatiya *et al.* (2011) dengan menggunakan asam galat sebagai standar. 4 gr ekstrak ditambahkan aquades hingga 125 ml untuk ekstrak dengan pelarut air dan hingga 250 ml untuk ekstrak dengan pelarut etanol. 1 ml diambil dari larutan awal dan ditambahkan reagen folin 0,5 ml dan 1 ml Na_2CO_3 jenuh. Ditambahkan aquades hingga 10 ml. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 760 nm. Kurva standar asam galat didapatkan dengan menimbang 10,4 gr asam galat dan diencerkan dengan air hingga 100 ml. Dilakukan peneraan absorbansi pada konsentrasi larutan 0; 0,0104; 0,0208; 0,0312; 0,0416; dan 0,052 mg/ml. *Plotting* antara konsentrasi asam galat dengan absorbansinya dilakukan untuk mendapatkan persamaan. Kadar total fenol didapatkan dengan terlebih dahulu mencari nilai x dengan cara memasukan bacaan

absorbansi sampel (y) pada persamaan ($y=ax+b$) yang didapat dari *plotting* konsentrasi asam galat terhadap absorbansinya. Kadar total fenol dinyatakan dalam ekivalen asam galat (mg eq asam galat/100 mg ekstrak) dan dihitung dengan rumus:

$$\text{Total fenol (mg eq asam galat/100 mg ekstrak)} = \frac{x \times fp \times 100}{\text{berat sampel}}$$

Keterangan : x = nilai absorbansi setelah dimasukkan ke dalam persamaan asam galat

fp = faktor pengenceran

Analisis aktivitas antioksidan. Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan 2 macam metode, DPPH dan *Reducing Power*. **DPPH.** Analisis ini menggunakan metode yang telah digunakan oleh Bhat dan Nabilah (2014) dan Tatiya *et al.* (2011). 0,2 gram ekstrak diencerkan dengan metanol hingga 10 ml. 0,5 ml dari larutan awal diambil dan ditambah DPPH 0,2 mM 1 ml. Diinkubasi selama 30 menit dalam keadaan gelap. Ditambahkan metanol hingga 5 ml. Absorbansi ditera dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm. Persentase DPPH dihitung dengan rumus :

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{(1 - \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}}) \times fp \times 100\%}{\text{berat sampel (mg)}}$$

Keterangan : A_{sampel} = nilai absorbansi sampel

A_{blanko} = nilai absorbansi blanko

fp = faktor pengenceran

Reducing power. Metode ini dilakukan menurut metode yang digunakan oleh Tatiya *et al.* (2011). 1 ml ekstrak ditambah 2,5 ml buffer potasium fosfat (0,2 M, pH 6,6) dan 2,5 ml $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C . 3) 2,5 ml asam trikloroasetat (10%) ditambahkan. Disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit, lapisan atas (2,5 ml) diambil dan ditambahkan dengan air destilasi (2,5 ml). 0,5 ml klorat besi (FeCl_3) (0,1% w/v) ditambahkan. Didiamkan selama 30 menit sebelum absorbansi ditera dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm. Asam askorbat digunakan pada metode ini sebagai standar. Untuk mendapatkan nilai absorbansi asam askorbat

Tabel 4.1 Hasil Analisis Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Melinjo

Sampel	Pelarut dan Suhu Ekstraksi	Total Fenol (mg eq asam galat/100 mg ekstrak)	DPPH (%)	Reducing Power (%)
Aq45	Aquades 45°C	0,080±0,001	1,84±0,06	22,71±0,86
Aq60	Aquades 60°C	0,135±0,005	2,15±0,05	31,24±0,90
Aq75	Aquades 75°C	0,172±0,000	2,87±0,03	41,73±0,51
Et45	Etanol 50% 45°C	0,353±0,003	4,88±0,04	68,08±1,29
Et60	Etanol 50% 60°C	0,350±0,003	5,32±0,02	75,17±0,67
Et75	Etanol 50% 75°C	0,365±0,003	5,96±0,04	80,90±0,86

Keterangan : Angka yang tercantum merupakan rata-rata dari 2 kali analisis. Aq = ekstraksi dengan aquades; Et = ekstraksi dengan etanol; angka yang menyertai Aq atau Et menunjukkan suhu ekstraksi (45; 60; atau 75°C).

dilakukan dengan metode yang sama dengan mengganti sampel dengan asam askorbat. Persentase Reducing Power dihitung dengan rumus :

$$\text{Reducing Power (\%)} = \frac{A1 - A0}{A1} \times 100\%$$

Keterangan : A1 = nilai absorbansi asam askorbat
A0 = nilai absorbansi sampel

Analisis aktivitas antimikrobia. Analisis aktivitas antimikrobia dilakukan dengan metode *well-diffusion* seperti yang telah dilakukan oleh Parhusip dan Sitanggang (2011) dan Tatiya *et al.* (2011). 10^7 CFU/ml bakteri diinokulasikan dalam nutrien broth untuk diinkubasi terlebih dahulu selama 24 jam. Nutrien broth yang berisi bakteri diinokulasi dalam nutrien agar hangat dan dimasukkan ke dalam cawan petri. 6 lubang (sumur) dibuat dengan menggunakan borer setelah agar mengeras. Ekstrak dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30% diisikan ke sumur pada setiap cawan petri. Diinkubasi pada 27°C selama 24 jam. Diameter zona bening diukur.

Rancangan penelitian. Penelitian ini menggunakan 2 kali pengulangan ekstraksi dan 2 kali ulangan analisis. total fenol dan aktivitas antioksidan (DPPH dan *Reducing Power*) dianalisis menggunakan spektrofotometri. Aktivitas antimikrobia (*well-diffusion*) diukur diameter penghambatannya dengan menggunakan jangka sorong. Kemudian dicari rata-rata dari setiap perlakuan. Faktor yang diteliti dalam penelitian ini adalah pengaruh variasi suhu dan pelarut terhadap aktivitas antioksidan dan antimikrobia dari ekstrak.

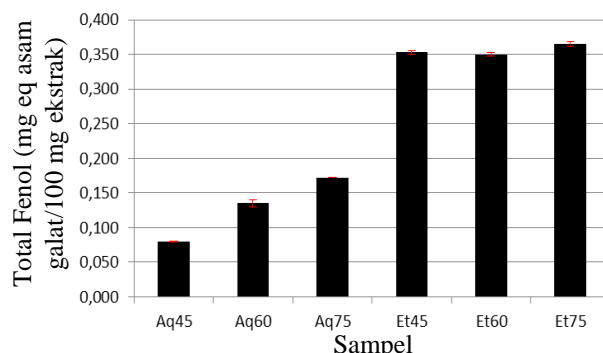
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, dilakukan ekstraksi terhadap biji melinjo, yang telah dikeringkan terlebih dahulu, dengan variasi suhu dan pelarut

ekstraksi seperti yang telah ditentukan. Pemberian variasi pada suhu dan pelarut bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari suhu dan pelarut terhadap aktivitas antioksidan dan antimikrobia ekstrak biji melinjo. Suhu yang digunakan pada penelitian ini adalah 45°C, 60°C, dan 75°C. Sementara itu, pelarut yang digunakan adalah aquades dan etanol 50%. Waktu ekstraksi selama 24 jam dan ekstraksi untuk setiap variasi dilakukan 2 kali. Sampel didapatkan dengan menyaring hasil ekstraksi dengan *vacuum pump* dan mengambil cairan hasil penyaringan untuk dianalisis.

A. Total Fenol

Mekanisme dasar dari metode Folin-Ciocalteu adalah reaksi oksidasi atau reduksi yang didasarkan pada sifat redoks dari senyawa antioksidan yang dapat bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu, mempertajam pengukuran konsentrasi senyawa fenolik. Pada **Gambar 4.1**, dapat dilihat bahwa pengaruh suhu dan pelarut menyebabkan munculnya perbedaan pada kadar total fenol ekstrak biji melinjo.



Gambar 4.1 Total Fenol (%) Ekstrak Biji Melinjo Dengan Pelarut Etanol & Air Pada Beberapa Suhu Perlakuan

Ekstrak yang dilakukan dengan aquades maupun etanol 50% mengalami peningkatan kadar total fenol seiring dengan meningkatnya suhu ekstraksi. Seperti yang

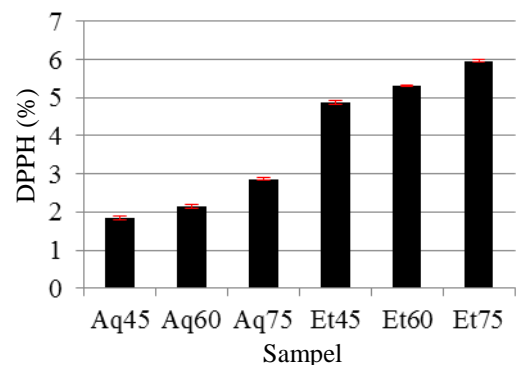
terlihat pada total fenol sampel Aq45, Aq60, dan Aq75 yang meningkat seiring dengan semakin tingginya suhu ekstraksi. Namun, pada sampel Et45 dan Et60 yang menggunakan etanol 50% sebagai pelarut dan suhu ekstraksi 45 dan 60°C menghasilkan total fenol yang hampir sama, yaitu $0,353 \pm 0,003$ mg/100 mg ekstrak dan $0,350 \pm 0,003$ mg/100 mg ekstrak. Walaupun begitu, sampel Et75 yang menggunakan pelarut etanol 50% dan suhu ekstraksi 75°C memberikan hasil yang lebih tinggi dan berdasarkan total fenol sampel Et45, Et60, dan Et75 apabila suhu semakin tinggi maka total fenol semakin tinggi pula. Menurut Wazir *et al.* (2011), penggunaan suhu tinggi untuk melakukan ekstraksi meningkatkan kelarutan dari fenol. Suhu tinggi mampu melepaskan senyawa fenol sel dinding atau senyawa fenolik yang terikat disebabkan oleh rusaknya unsur-unsur sel, menyebabkan semakin banyak senyawa fenol yang terekstrak.

Sementara itu, perbedaan pelarut yang digunakan menunjukkan perbedaan yang jelas. Penggunaan pelarut etanol 50% memberikan total fenol yang jauh lebih tinggi apabila dibandingkan dengan ekstrak yang menggunakan aquades. Menurut Chew *et al.* (2011), penggunaan pelarut yang dikombinasi memberikan hasil total fenol lebih tinggi apabila dibandingkan dengan pelarut tunggal. Sehingga wajar apabila total fenol pada ekstrak yang menggunakan pelarut etanol 50% lebih tinggi daripada yang menggunakan aquades. Secara kuantitas, sampel Et75 dengan pelarut etanol 50% dan suhu 75°C memberikan hasil sebesar $0,365 \pm 0,003$ mg/100 mg ekstrak yang merupakan total fenol tertinggi dari semua sampel. Sementara sampel Aq45 yang menggunakan pelarut aquades dan suhu ekstraksi 45°C menunjukkan hasil terendah di antara semua sampel, yaitu $0,080 \pm 0,001$ mg/100 mg ekstrak. Perlunya analisis kadar total fenol ini menurut Bahri-Sahloul *et al.* (2014) adalah adanya kaitan antara aktivitas antioksidan dan antimikrobia dan dipengaruhi oleh komposisi dari senyawa fenolik.

B. Aktivitas Antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan dua metode yaitu, DPPH dan *reducing power*. Penggunaan dua metode analisis antioksidan yang berbeda disebabkan oleh perbedaan mekanisme kerja dari kedua analisis. Apabila digolongkan, terdapat dua tipe antioksidan yang utama, dapat disebut antioksidan primer dan sekunder yang berbeda dalam mekanisme kerjanya. Antioksidan primer mengikat radikal bebas dan memberikan sebuah atom hidrogen atau elektron untuk menstabilkan radikal bebas. Di sisi lain, antioksidan sekunder bekerja dengan menekan pembentukan radikal bebas yang kemudian mencegah kerusakan oksidatif (Hue *et al.*, 2012).

DPPH merupakan radikal bebas pada suhu ruang dan menerima elektron dan hidrogen radikal untuk menjadi molekul stabil. Metode ini telah digunakan untuk menganalisis antioksidan seperti polifenol. DPPH diberi hidrogen oleh polifenol, membentuk DPPH yang telah tereduksi. Kemudian terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning setelah reduksi, yang bisa diukur melalui penurunan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm (Subramanian, 2013).



Gambar 4.2 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Melinjo Pada Pelarut Etanol & Air Pada Beberapa Suhu Perlakuan Dengan Metode DPPH (%)

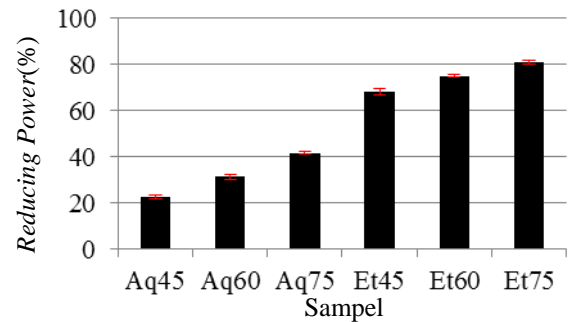
Melalui **Gambar 4.2** dapat dilihat pengaruh dari perbedaan suhu dan pelarut ekstraksi yang digunakan pada setiap sampel. Sampel Et75, yang menggunakan suhu ekstraksi 75°C dan pelarut etanol 50%, memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi, $5,96 \pm 0,04\%$, dan sampel Aq45, yang menggunakan suhu ekstraksi 45°C dan

pelarut aquades, memiliki aktivitas antioksidan yang terendah, $1,84 \pm 0,06\%$. Persentase DPPH pada penelitian ini menunjukkan jumlah DPPH radikal yang direduksi menjadi stabil oleh ekstrak biji melinjo. Sampel yang menggunakan suhu ekstraksi 45°C selalu lebih rendah dibandingkan dengan sampel yang menggunakan suhu ekstraksi 60°C dan 75°C dan sampel dengan suhu ekstraksi 60°C selalu lebih rendah dibandingkan dengan sampel dengan suhu ekstraksi 75°C .

Apabila dipisahkan menurut pelarut yang digunakan, sampel Aq45, Aq60, dan Aq75 menggunakan aquades sebagai pelarut dan sampel Et45, Et60, dan Et75 menggunakan etanol 50% sebagai pelarut. Perbedaan pelarut yang digunakan tampak berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan sampel. Sampel dengan pelarut etanol 50% lebih tinggi kira-kira dua kali lipat bila dibandingkan dengan sampel yang menggunakan aquades sebagai pelarut.

Hasil yang sama juga dikemukakan oleh Kato *et al.* (2009) pada penelitiannya tentang ekstrak biji melinjo dengan menggunakan pelarut etanol. Lebih lanjut lagi, pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa enam stilbenoid yang terkandung dalam ekstrak biji melinjo memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH radikal dan hal ini disebabkan oleh kemampuan keenam stilbenoid tersebut untuk mendonorkan elektron dalam jumlah besar kepada DPPH radikal.

Analisis *reducing power* digunakan untuk menganalisis kemampuan mereduksi dari ekstrak untuk mengkonversi *potassium ferricyanide* (Fe^{3+}) kompleks membentuk *potassium ferrocyanide* (Fe^{2+}). *Potassium ferrocyanide* kemudian bereaksi dengan *ferric chloride* membentuk *ferrous* kompleks yang absorbansi maksimalnya dapat dibaca pada 700 nm (Hue *et al.*, 2012). Keberadaan reduktor (antioksidan) menyebabkan reduksi dari Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} , maka dari itu berdasarkan pembentukan warna yang terjadi, pengamatan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 700 nm dapat mengamati konsentrasi dari Fe^{2+} (Ferreira *et al.*, 2007).



Gambar 4.3 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Melinjo Pada Pelarut Etanol & Air Pada Beberapa Suhu Perlakuan Dengan Metode *Reducing Power*(%)

Pada **Gambar 4.3** yang menggambarkan hasil analisis *reducing power* dalam grafik batang juga terlihat kecenderungan yang sama dengan dua analisis sebelumnya. Peningkatan suhu ekstraksi yang digunakan menyebabkan peningkatan dari *reducing power* sampel. Begitu pula dengan penggunaan pelarut ekstraksi, terlihat bahwa sampel dengan pelarut etanol 50% memperlihatkan hasil yang lebih baik apabila dibandingkan dengan sampel dengan pelarut aquades. Sampel Et75 yang menggunakan pelarut etanol 50% dan suhu ekstraksi 75°C menunjukkan kemampuan reduksi yang terbesar dengan persentase mencapai $80,90 \pm 0,86\%$ dan apabila diurutkan sampel Et60 memiliki nilai terbesar kedua kemudian sampel Et45, sampel Aq75, sampel Aq60, dan persentase terendah ($22,71 \pm 0,86\%$) ditunjukkan sampel Aq45 yang menggunakan pelarut aquades dan suhu ekstraksi 45°C . Persentase *reducing power* pada penelitian ini menunjukkan banyaknya Fe^{2+} kompleks yang terbentuk setelah dilakukan penambahan ekstrak biji melinjo ke dalam larutan.

Selain melalui persentase aktivitas antioksidan, analisis *reducing power* dapat dinilai hasilnya melalui absorbansi sampel. Semakin tinggi absorbansi dari sampel, semakin tinggi pula kemampuan mereduksinya (Tatiya *et al.*, 2011). **Tabel 4.2** menunjukkan data absorbansi sampel ekstrak biji melinjo yang dianalisis dengan metode *reducing power*, berdasarkan absorbansinya Et75 memiliki kemampuan mereduksi terbesar diantara keenam sampel kemudian Et60, Et45, Aq75, Aq60, dan yang memiliki

Tabel 4.2 Hasil Analisis *Reducing Power* Ekstrak Biji Melinjo Berdasarkan Absorbansi

Sampel	Pelarut dan Suhu Ekstraksi	<i>Reducing Power</i>
Aq45	Aquades 45°C	0,168±0,006
Aq60	Aquades 60°C	0,232±0,007
Aq75	Aquades 75°C	0,309±0,004
Et45	Etanol 50% 45°C	0,505±0,010
Et60	Etanol 50% 60°C	0,557±0,005
Et75	Etanol 50% 75°C	0,600±0,006

Keterangan : Angka yang tercantum merupakan rata-rata dari 2 kali analisis. Aq = ekstraksi dengan aquades; Et = ekstraksi dengan etanol; angka yang menyertai Aq atau Et menunjukkan suhu ekstraksi (45; 60; atau 75°C).

kemampuan mereduksi terendah adalah Aq45.

Kedua metode analisis aktivitas antioksidan menunjukkan kecenderungan yang sama dengan sampel Et75 memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi di antara 6 sampel analisis. Begitu pula apabila kedua metode ini dibandingkan dengan total fenol sampel. Tren yang ditunjukkan cenderung mirip dan dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi kadar total fenol semakin tinggi pula aktivitas antioksidan dari ekstrak biji melinjo.

C. Aktivitas Antimikrobia

Metode *well-diffusion* digunakan untuk menganalisis aktivitas antimikrobia dari ekstrak. Untuk analisis antimikrobia digunakan dua macam bakteri, *Bacillus cereus* FNCC 0057 (Gram-positif) dan *Escherichia coli* FNCC 0091 (Gram-negatif), yang merupakan bakteri patogen pada makanan. Analisis aktivitas antimikrobia menggunakan metode *well-diffusion* atau metode sumuran yang digunakan pula oleh Parhusip dan Sitanggang (2011) dan Tatiya *et al.* (2011). Pada dasarnya dengan metode ini, bakteri yang digunakan diinokulasikan pada nutrient broth dan didiamkan selama 24 jam terlebih dahulu, baru setelahnya dicampur dengan nutrient agar sebelum dituangkan ke dalam cawan petri. Setelah sedikit mengeras, dengan menggunakan borer dapat dibuat lubang atau sumuran untuk menempatkan sampel atau dalam penelitian ini ekstrak biji melinjo dan diharapkan terjadi difusi sehingga zona bening dapat terukur.

Tabel 4.3 dan **4.4** merupakan hasil analisis aktivitas antimikrobia ekstrak biji melinjo dalam beberapa konsentrasi dengan metode *well-diffusion* terhadap *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*. Aktivitas antimikrobia ekstrak terlihat dari seberapa besar diameter zona penghambatan yang muncul pada saat analisis. Dari setiap sampel, analisis dilakukan pada lima konsentrasi yang berbeda, antara lain 10, 15, 20, 25, dan 30%, dan tampak apabila dengan meningkatnya konsentrasi yang diberikan, aktivitas penghambatan yang digambarkan dengan diameter zona penghambatan semakin besar. Pengaruh suhu pada kedua grafik terlihat pada sampel Et45 (45°C), Et60 (60°C), dan Et75 (75°C) yang menggunakan suhu yang berbeda pada saat ekstraksi, semakin tinggi suhu yang digunakan saat ekstraksi, aktivitas antimikrobia semakin meningkat pula.

Pada kedua tabel, sampel Et75 yang menggunakan suhu 75°C pada saat ekstraksi merupakan sampel yang menunjukkan zona penghambatan terbesar atau dengan kata lain menunjukkan aktivitas antimikrobia yang tertinggi di antara keenam sampel. Sementara sampel dengan aquades sebagai pelarut (Aq45, Aq60, dan Aq75) tidak menunjukkan aktivitas antimikrobia, terlihat dari tidak terbentuknya zona penghambatan pada analisis terhadap kedua bakteri dan lamanya waktu penyimpanan sampel dicurigai menjadi penyebab terjadinya hal ini.

Parhusip dan Sitanggang (2011) pada penelitiannya yang menganalisis aktivitas antimikrobia ekstrak biji dan kulit melinjo

dengan menggunakan metode *well-diffusion* mendapatkan hasil bahwa ekstrak biji

melinjo dengan menggunakan etanol sebagai pelarut menunjukkan aktivitas antimikrobia

Tabel 4.3 Diameter Penghambatan Ekstrak Melinjo Terhadap *Bacillus cereus*

Sampel	<i>Bacillus cereus</i>				
	Zona Penghambatan (cm)				
	10%	15%	20%	25%	30%
Aq45	-	-	-	-	-
Aq60	-	-	-	-	-
Aq75	-	-	-	-	-
Et45	1,070±0,02	1,200±0,02	1,315±0,02	1,435±0,02	1,500±0,01
Et60	1,200±0,07	1,300±0,05	1,420±0,04	1,560±0,05	1,700±0,02
Et75	1,350±0,04	1,475±0,05	1,600±0,06	1,730±0,04	1,905±0,08

Keterangan : Angka yang tercantum merupakan rata-rata dari 2 kali analisis.
Aq = ekstraksi dengan aquades; Et = ekstraksi dengan etanol;
angka yang menyertai Aq atau Et menunjukkan suhu ekstraksi (45; 60; atau 75°C).

Tabel 4.4 Diameter Penghambatan Ekstrak Melinjo Terhadap *Escherichia coli*

Sampel	<i>Escherichia coli</i>				
	Zona Penghambatan (cm)				
	10%	15%	20%	25%	30%
Aq45	-	-	-	-	-
Aq60	-	-	-	-	-
Aq75	-	-	-	-	-
Et45	0,740±0,03	0,800±0,02	0,875±0,04	1,020±0,03	1,085±0,01
Et60	0,880±0,06	0,940±0,05	1,020±0,05	1,095±0,02	1,150±0,03
Et75	1,070±0,08	1,130±0,04	1,195±0,05	1,240±0,04	1,300±0,03

Keterangan : Angka yang tercantum merupakan rata-rata dari 2 kali analisis.
Aq = ekstraksi dengan aquades; Et = ekstraksi dengan etanol;
angka yang menyertai Aq atau Et menunjukkan suhu ekstraksi (45; 60; atau 75°C).

yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan sampel lain yang menggunakan pelarut etil asetat dan heksana.

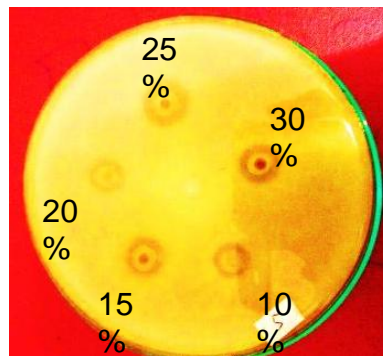
Penggunaan dua macam bakteri berbeda pada analisis aktivitas antimikrobia ekstrak biji melinjo dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak terhadap kedua macam bakteri tersebut. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri Gram-positif (*Bacillus cereus*) dan bakteri Gram-negatif (*Escherichia coli*). Melalui data yang didapat pada penelitian ini, terlihat bahwa ekstrak biji melinjo memiliki aktivitas antimikrobia yang lebih tinggi pada *Bacillus cereus* atau pada bakteri Gram-positif. Menurut Parhusip dan Sitanggang (2011), bakteri Gram-negatif memiliki beberapa lapisan kompleks pada dinding selnya. Struktur dari dinding sel bakteri Gram-

negatif mengandung peptidoglikan dan membran luar (liposakarida dan lipoprotein). Keberadaan membran luar pada bakteri Gram-negatif menyebabkan penghambatan difusi terhadap ekstrak di dalam membran peptidoglikan dan sel bakteri menemui kondisi yang tidak sesuai bagi ekstrak untuk berdifusi ke dalam sel.

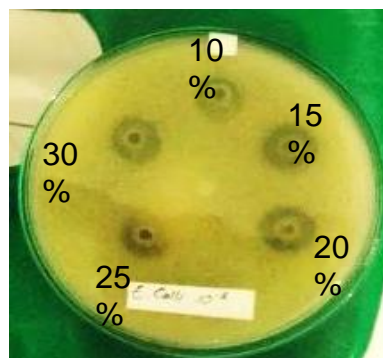
KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Peningkatan suhu ekstraksi sebesar 15°C memberikan peningkatan total fenol dan aktivitas antioksidan (persentase DPPH dan *reducing power*) ekstrak biji melinjo. Penggunaan pelarut etanol memberikan hasil lebih baik apabila dibandingkan dengan pelarut aquades.



Gambar 4.4 Hasil Analisis Aktivitas Antimikrobia Ekstrak Biji Melinjo Et75 dengan *Bacillus cereus*



Gambar 4.5 Hasil Analisis Aktivitas Antimikrobia Ekstrak Biji Melinjo Et75 dengan *Escherichia coli*

2. Peningkatan suhu ekstraksi sebesar 15°C menyebabkan peningkatan aktivitas antimikrobia ekstrak biji melinjo. Sampel yang menggunakan pelarut aquades tidak menunjukkan aktivitas antimikrobia, sementara sampel yang menggunakan pelarut etanol menunjukkan aktivitas antimikrobia terhadap *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*.
3. Perlakuan suhu ekstraksi 75°C dan pelarut etanol 50% memiliki total fenol, aktivitas antioksidan (persentase DPPH dan *reducing power*), dan aktivitas antimikrobia yang tertinggi di antara keenam sampel yang ada.

SARAN

1. Penelitian ini menyimpulkan bahwa peningkatan suhu berbanding lurus dengan peningkatan total fenol, aktivitas antioksidan dan aktivitas antimikrobia dari ekstrak biji melinjo baik dengan pelarut etanol maupun aquades. Terbukti dengan tingginya hasil yang didapat dengan menggunakan suhu 75°C, namun masih ada kemungkinan bahwa suhu 75°C bukan merupakan suhu optimal dari ekstraksi biji melinjo, sehingga masih terbuka kemungkinan untuk menganalisis

efek penggunaan suhu yang lebih tinggi lagi kedepannya.

2. Berdasarkan hasil penelitian ini ekstrak dengan pelarut etanol 50% memberikan hasil terbaik, namun masih perlu dilakukan variasi penelitian lainnya seperti variasi konsentrasi etanol pada pelarut dan efeknya terhadap aktivitas antioksidan dan antimikrobia ekstrak yang dihasilkan.
3. Pada penelitian ini tidak terdapat aktivitas antimikrobia yang terlihat dari ekstrak yang menggunakan pelarut air. Selang waktu sejak selesainya ekstraksi dengan masa analisis yang dilakukan merupakan kemungkinan terbesar penyebab dari terjadinya hal ini. Dengan demikian, kedepannya dimungkinkan juga dilakukan penelitian pengaruh masa simpan ekstrak biji melinjo terhadap aktivitas antimikrobianya.
4. Aplikasi lebih lanjut dari ekstrak biji melinjo sangat perlu dipelajari karena tingginya potensi antioksidan dan antimikrobia dari ekstrak yang dihasilkan, baik sebagai suplemen makanan, bahan tambahan atau substitusi tepung, atau juga sebagai pengawet makanan karena ekstrak dengan pelarut etanol 50% menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen makanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahri-Sahloul R, Ben Fredj R, Boughalleb N, Shriaa J, Saguem S, Hilbert JL, Trotin F, Ammar S, Bouzid S, dan Harzallah-Skhiri F. 2014. *Phenolic Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts Obtained from Crataegus azarolus L. var. Aronia (Willd.) Batt. Ovaries Calli*. Journal of Botany. Article ID 623651. Hindawi Publishing.
- Bhat dan Nabilah. 2014. *Evaluating Belinjau (Gnetum gnemon L.) Seed Flour Quality as a Base for Development of Novel Food Products and Food Formulations*. Food Chemistry 156: 42-49.
- Chew KK, Ng SY, Thoo YY, Khoo MZ, Wan Aida WM, dan Ho CW. 2011. *Effect of Ethanol Concentration, Extraction Time and Extraction Temperature on the Recovery of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Centella asiatica Extracts*. International Food Research Journal 18: 571-578.
- Ferreira ICFR, Paula Baptista, Miguel Vilas-Boas, dan Lillian Barros. 2007. *Free-Radical Scavenging Capacity and Reducing Power of Wild Edible Mushrooms from Northeast Portugal: Individual Cap and Stipe Activity*. Food Chemistry. 100: 1511-1516.
- Hue SM, Amru Nasrulhaq Boyce, dan Chandran Somasundram. 2012. *Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Contents in the Leaves of Different Varieties of Sweet Potato (Ipomoea batatas)*. Australian Journal of Crop Science. Vol. 6(3): 375-380.
- Kato E, Tokunaga Y, dan Sakan F. 2009. *Stilbenoids Isolated from the Seeds of Melinjo (Gnetum gnemon L.) and Their Biological Activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 57: 2544-2549.
- Parhusip dan Sitanggang. 2011. *Antimicrobial Activity of Melinjo Seed and Peel Extract (Gnetum gnemon) Against Selected Pathogenic Bacteria*. Microbiology Indonesia. Vol 5: 103-112.
- Subramanian R, Palanivel Subbramaniyan, dan Vairamuthu Raj. 2013. *Antioxidant Activity of the Stem Bark of Shorea roxburghii and Its Silver Reducing Power*. SpringerPlus. Vol. 2:28.
- Sunanto H. 1991. *Budidaya Melinjo dan Usaha Produksi Emping*. Kanisius. Yogyakarta.
- Tani H, Hikami S, Iizuna S, Yoshimatsu M, Asama T, Ota H, Kimura Y, Tatefuji T, Hashimoto K, dan Higaki K. 2014. *Pharmacokinetics and Safety of Resveratrol Derivatives in Humans after Oral Administration of Melinjo (Gnetum gnemon L.) Seed Extract Powder*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 62: 1999-2007.
- Tatiya AU, Tapadiya GG, Kotecha S, dan Surana SJ. 2011. *Effects of Solvents on Total Phenolics, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bridelia retusa Spreng. Stem Bark*. Indian Journal of Natural Products and Resources. Vol. 2: 442-447.
- Wazir Dayana, Syahida Ahmad, Radzali Muse, Maziah Mahmood, MY Shukor. 2011. *Antioxidant Activities of Different Parts of Gnetum gnemon L.* Journal Plant Biochemistry and Biotechnology.