

KARAKTERISASI EKSTRAK KULIT MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) MERAH SEBAGAI KOMPONEN ANTIBAKTERI

[CHARACTERIZATION OF RED MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) SKIN EXTRACT AS AN ANTIBACTERIAL COMPOUND]

Veliana Angel¹, Adolf J. N. Parhusip^{2*}

^{1,2}Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan,
Jl. Thamrin Boulevard 1100, Tangerang, Banten, Indonesia

*Korespondensi penulis: adolff.parhusip@uph.edu

ABSTRACT

*Melinjo peel is generally disposed, even though it contains bioactive compounds such as tannin, flavonoid and saponin, which can be used as antimicrobial compound. The purpose of this research was to analyze the antimicrobial activity of melinjo peel extract. The extraction of red melinjo peel was conducted by maceration method using ethyl acetate as solvent for 24 h at room temperature. The extract at concentration 4, 8, 12, and 16% (w/v) could not inhibit the growth of *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959, whereas could inhibit the growth of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 10876, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the extract was ranged from 0.50-0.69%, while the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) value was ranged from 2.00-2.76%. The phytochemical compounds that found in extract were alkaloids, saponin, phenolic, flavonoids and glycosides. The inhibitory capacity of the extract at selected concentration (12%) had a similar level as compared to 1000 ppm Colistin against *E. coli* and *P. aeruginosa*. The inhibition of extract increased at low pH (pH 4), while neutral pH decreased the inhibition of the extract. Heat treatment at 65°C for 30 minutes increased the antibacterial activity, whereas heat treatment at 75, 85, and 95°C decreased the antibacterial activity of the extract. Addition of salt and sugar at concentration 1-5% and 10-50%, respectively, increased the antibacterial activity of the extract. The extract could damage cell morphology and was confirmed by the presence of ions (Ca^{2+} , K^+ , and Mg^{2+}) outside of the cells.*

Keywords: antimicrobial; bacterial; cell damage; melinjo

ABSTRAK

Kulit melinjo umumnya dibuang, padahal mengandung komponen bioaktif seperti tanin, flavonoid, dan saponin, yang dapat dimanfaatkan sebagai komponen antimikroba. Tujuan penelitian ini karakterisasi komponen bioaktif ekstrak kulit melinjo merah sebagai antibakteri. Proses ekstraksi kulit melinjo merah dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah pada konsentrasi 4, 8, 12, dan 16% (w/v) tidak dapat menghambat kapang *R. oligosporus* ATCC 22959, namun dapat menghambat bakteri *E. coli* ATCC 8739, *B. cereus* ATCC 10876, dan *P. aeruginosa* ATCC 9027. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dari ekstrak terhadap ketiga bakteri uji berturut-turut adalah 0.50-0.69%, dan 2.00-2.76%. Komponen fitokimia yang terdapat pada ekstrak etil asetat terdiri dari alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, dan glikosida. Ekstrak etil asetat dengan konsentrasi terpilih (12%) memiliki diameter zona hambat hampir setara dengan antibiotik kolistin 1000 ppm terhadap bakteri *E. coli* dan *P. aeruginosa*. Ekstrak pada kondisi asam (pH 4) memiliki diameter zona hambat lebih besar dibandingkan pH netral (pH 7). Pemanasan

ekstrak pada suhu 65°C selama 30 menit akan meningkatkan diameter zona hambat, dan menurun pada suhu pemanasan 75, 85, dan 95°C. Penambahan garam dan gula masing-masing pada konsentrasi 1-5% dan 10-50% akan meningkatkan diameter zona hambat ekstrak. Ekstrak dapat merusak morfologi ketiga bakteri uji, yang didukung dengan keluarnya ion-ion penyusun dinding sel (Ca^{2+} , K^+ , dan Mg^{2+}). Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah memiliki komponen bioaktif yang mampu membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroba uji.

Kata kunci: antimikroba; bakteri; melinjo; kerusakan sel

PENDAHULUAN

Produksi tanaman melinjo meningkat dari 197.648 ton pada tahun 2014, menjadi 213.025 ton pada tahun 2015 (Badan Pusat Statistik, 2015). Bagian kulit melinjo kadang digunakan untuk membuat sayur, namun umumnya kulit melinjo dibuang (Parhusip & Sitanggang, 2011). Kulit melinjo mengandung komponen bioaktif seperti tanin, flavonoid, dan saponin (Octavia, 2010). Oleh karena itu, diperlukan pemanfaatan lebih lanjut dari kulit melinjo, sebagai komponen antimikroba. Zat antimikroba adalah senyawa biologis atau kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba (Yanuhar, 2016). Hasil penelitian Parhusip & Sitanggang (2011) menunjukkan bahwa kulit melinjo dengan konsentrasi 15% menggunakan pelarut etil asetat dapat menghambat bakteri *P. aeruginosa* sebanyak 6,73 mm, lebih besar dibandingkan antibiotik penisilin G yang tidak mampu menghambat *P. aeruginosa*.

Pada penelitian ini digunakan kulit melinjo berwarna merah. Penelitian Siregar

et al. (2009) menunjukkan bahwa kulit melinjo merah memiliki kandungan total fenolik lebih tinggi (0,386 mg GAE/g sampel) dibandingkan kulit melinjo kuning (0,103 mg GAE/g sampel) dan hijau (0,095 mg GAE/g sampel). Komponen fenolik bersifat sebagai senyawa antibakteri karena keberadaan gugus hidroksil yang bersifat reaktif (Gyawali & Ibrahim, 2014). Parhusip & Sitanggang (2011) menunjukkan hasil bahwa ekstrak etil asetat kulit melinjo pada konsentrasi 15% mampu menghambat bakteri *P. aeruginosa* dengan diameter 6,64 mm, lebih besar dibandingkan ekstrak etanol kulit melinjo yang sama sekali tidak dapat menghambat *P. aeruginosa* pada konsentrasi yang sama.

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan terhadap empat jenis mikroba, yaitu *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, dan *R. oligosporus*. Keempat jenis mikroba ini merupakan mikroba patogen yang umum tersebar di lingkungan. Masing-masing mikroba mewakili bakteri Gram negatif, bakteri Gram positif pembentuk spora, dan kapang sehingga analisis aktivitas

antimikroba dapat diketahui efektivitasnya berdasarkan jenis mikroba.

Aktivitas antimikroba dari ekstrak etil asetat kulit melinjo merah pada berbagai konsentrasi diuji terhadap empat jenis bakteri, lalu ditentukan ekstrak dengan konsentrasi terpilih. Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih dianalisis lebih lanjut komponen fitokimianya secara kualitatif, lalu aktivitas antimikrobanya dibandingkan dengan senyawa antibiotic. Selanjutnya, dilakukan pengujian stabilitas ekstrak terpilih pada berbagai pH, suhu pemanasan, konsentrasi garam, dan gula. Selain itu, pengaruh ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih diuji terhadap kebocoran ion dan morfologi mikroba dengan metode *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS) dan *Scanning Electron Microscope* (SEM).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit melinjo merah yang berasal dari Bogor, etil asetat teknis, akuades, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), kultur *B. cereus* ATCC 10876 dari Institut Pertanian Bogor (IPB), kultur *E. coli* ATCC 8739 dari IPB, kultur *P. aeruginosa* ATCC 9027 dari IPB, kultur *R. oligosporus* ATCC 22959 dari IPB, amil alkohol, larutan FeCl₃ kloroform, ammonia, H₂SO₄, kertas saring Whatman no. 1, HCl,

KOH 0,5 M, hidrogen peroksida 5%, benzena, asam asetat anhidrat, KH₂PO₄.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cabinet dryer* (Memmert), autoklaf (Hirayama), jarum ose, mikroskop (Olympus), *hairdryer* (Philips), incubator (Memmert), mikropipet (Gilson), tabung ulir (Pyrex), *vortex* (Thermolin), *waterbath* (Memmert), *heater* (Torrey Pines Scientific), *magnetic stirrer*, *rotary evaporator* (Buchi), pH meter (Mettler), oven, timbangan analitik (Ohaus), *centrifuge* (Sigma), AAS (Buck Scientific), SEM (Ciqtek)

Pembuatan Bubuk dan Ekstraksi Kulit Melinjo Merah

Pembuatan bubuk dan ekstraksi kulit melinjo merah dilakukan berdasarkan metode dari Kato *et al.* (2009) dengan modifikasi. Buah melinjo merah dicuci dan dikupas kulitnya, kemudian bagian biji dibuang, kulit melinjo merah dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* pada suhu 50°C selama 24 jam. Kulit melinjo merah kering dikecilkan ukurannya menggunakan ayakan 35 mesh sehingga diperoleh bubuk kulit melinjo merah. Bubuk kulit melinjo merah diekstraksi dengan pelarut etil asetat dengan rasio bubuk dan pelarut 1:4. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 110 rpm. Hasil ekstraksi disaring diperoleh filtrat dan ampas. Ampas dibuang, filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan

alat *rotary evaporator* pada suhu 55°C, kemudian dihembuskan gas nitrogen sehingga diperoleh ekstrak etil asetat kulit melinjo merah.

Uji Aktivitas Antimikroba Metode Difusi Sumur

Uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi sumur dilakukan berdasarkan metode dari Misna & Diana (2016) dan Dewi *et al.* (2012) dengan modifikasi. Konsentrasi ekstrak etil asetat kulit melinjo merah 0, 4, 8, 12, dan 16% dan dikontakkan pada media NA berisi mikroba uji. Cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan diameter zona hambat diukur.

Penentuan Komponen Fitokimia Kualitatif

Penentuan komponen fitokimia secara kualitatif meliputi flavonoid (Nugrahani *et al.*, 2016), fenolik (Tamilselvi *et al.*, 2012), alkaloid (Syafitri *et al.*, 2014), steroid dan triterpenoid (Syafitri *et al.*, 2014), terpenoid (Ergina *et al.*, 2014), tanin (Syafitri *et al.*, 2014), saponin (Asmara, 2017; Syafitri *et al.*, 2014), dan glikosida (Depkes RI, 1989).

Uji Perbandingan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Terpilih dengan Antibiotik

Uji perbandingan aktivitas antimikroba ekstrak dengan antibiotik dilakukan dengan metode difusi sumur (Octavia, 2010). Antibiotik yang digunakan adalah penisilin G dan kolistin. Prosedur yang digunakan sama dengan prosedur

pengujian aktivitas antimikroba difusi sumur (Dewi *et al.*, 2012). Untuk sampel antibiotik, digunakan konsentrasi 10, 100, dan 1.000 ppm lalu dimasukkan ke dalam sumur berdiameter 6 mm sebanyak 60 µL pada media *Nutrient Agar* (NA). Cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan diameter zona hambat diukur.

Uji Stabilitas Ekstrak Terpilih pada Berbagai pH, Suhu Pemanasan, Konsentrasi Garam, dan Gula

Pengujian stabilitas ekstrak terpilih pada berbagai pH dilakukan dengan mencampur ekstrak terpilih dengan larutan pada pH 4, 5, 6, dan 7, lalu aktivitas antimikroba diuji dengan metode difusi sumur (Ardiansyah *et al.*, 2003).

Pengujian stabilitas ekstrak terpilih pada berbagai suhu pemanasan dilakukan dengan memanaskan ekstrak pada suhu 65, 75, 85, dan 95°C selama 30 menit menggunakan *waterbath*. Selanjutnya ekstrak diuji aktivitas antimikrobanya dengan metode difusi sumur (Ardiansyah, 2002 dengan modifikasi).

Pengujian stabilitas ekstrak terpilih pada berbagai konsentrasi garam dilakukan dengan mencampurkan ekstrak terpilih ke dalam larutan garam steril dengan konsentrasi: 1, 2, 3, 4, dan 5%. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi sumur (Ardiansyah *et al.*, 2003).

Pengujian stabilitas ekstrak terpilih pada berbagai konsentrasi gula dilakukan dengan melarutkan ekstrak terpilih ke dalam larutan gula dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%. Aktivitas antimikroba diuji dengan metode difusi sumur (Ardiansyah, 2002).

Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)

Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) dilakukan berdasarkan metode dari Parhusip & Sitanggang (2011) dengan modifikasi. Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah ditambahkan ke dalam kultur bakteri sebanyak 12%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah ion Ca^{2+} dianalisis dengan alat AAS pada panjang gelombang 422,7 nm, ion K^{+} pada panjang gelombang 766,5 nm, dan ion Mg^{2+} pada panjang gelombang 285,2 nm.

Scanning Electron Microscope (SEM)

Scanning Electron Microscope (SEM) dilakukan berdasarkan metode dari Parhusip & Sitanggang (2011) dengan modifikasi. Kultur bakteri yang sudah disegarkan dalam media NB pada suhu 37°C selama 24 jam, ditambahkan dengan ekstrak etil asetat kulit melinjo merah sebanyak 12%. Campuran di *vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam alat *centrifuge* pada kecepatan 15.000 rpm selama 7 menit sehingga diperoleh endapan dan filtrat.

Filtrat dibuang, sedangkan endapan di analisis SEM. Endapan dioleskan pada plat yang dilapisi karbon. Kemudian, plat dilapisi dengan emas pada kondisi vakum, dan sampel sudah siap dimasukkan ke dalam alat SEM.

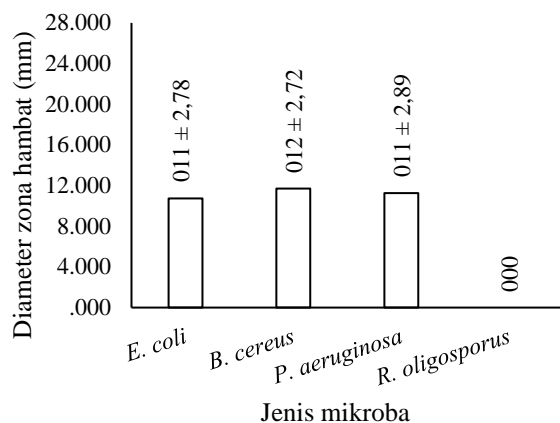
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak Etil Asetat Kulit Melinjo Merah

Persentase kulit pada buah melinjo merah adalah 36,10%. Kadar air kulit melinjo merah segar dengan kadar air 73,30% turun menjadi 5,58% setelah dikeringkan. Dalam proses pembuatan bubuk, rendemen yang dihasilkan sebesar 89,24%, dengan kadar air sebesar 9,87%. Rendemen ekstrak sebesar 1,41%.

Uji Aktivitas Antimikroba

Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah dapat menghambat bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa*, namun tidak dapat menghambat kapang *R. oligosporus* (Gambar 1). Kapang *R. oligosporus* tidak dapat dihambat oleh ekstrak etil asetat kulit melinjo merah karena ergosterol, yaitu sterol yang hanya terdapat pada membran fungi. Interaksi antara minyak esensial dan ergosterol akan menyebabkan kerusakan pada membran sel, sehingga isi sel fungi keluar (de Lira Mota *et al.*, 2012). Kemungkinan di dalam kulit melinjo merah tidak mengandung minyak esensial.

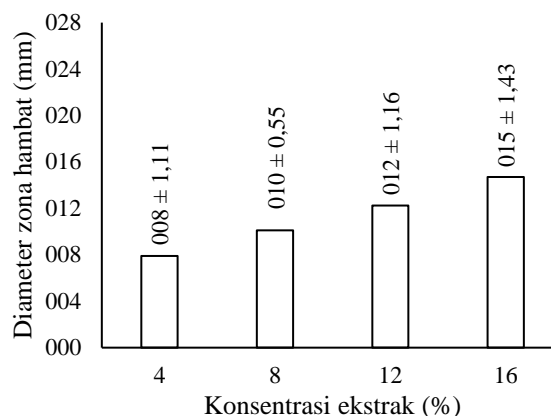


Gambar 1. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terhadap empat jenis mikroba

Diameter zona hambat bakteri Gram negatif (*E. coli* dan *P. aeruginosa*) lebih rendah dibandingkan bakteri Gram positif (*B. cereus*). Bakteri Gram negatif terdiri atas dua membran (bagian dalam dan luar) yang mengapit satu lapis peptidoglikan. Membran dalam bakteri Gram negatif sama seperti membran plasma bakteri Gram positif yang tersusun atas fosfolipid dan protein. Sementara, membran luar bakteri Gram negatif tersusun atas lipoprotein dan glikolipid (terdapat lipopolisakarida di luar) yang tidak terdapat pada membran plasma (Baurain *et al.*, 2016). Menurut Parhusip & Sitanggang (2011), membran sel luar akan menghambat komponen antimikroba untuk berdifusi ke dalam membran peptidoglikan dan sel bakteri.

Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka diameter zona hambat cenderung semakin besar. Hal ini dapat disebabkan oleh semakin banyak komponen antimikroba yang

terkandung di dalam ekstrak, sehingga diameter zona hambat yang terbentuk semakin besar. Menurut Widyasanti *et al.* (2016), diameter zona hambat lebih >20 mm termasuk sangat kuat, diameter zona hambat 10-20 mm kategori kuat, diameter zona hambat 5-10 mm kategori sedang, dan diameter zona hambat 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah. Sehingga ekstrak etil asetat kulit melinjo merah sudah termasuk ke dalam kategori kuat. Demi efisiensi, maka ditentukan ekstrak dengan konsentrasi terpilih sebesar 12%.



Gambar 2. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah pada berbagai konsentrasi

Nilai MIC, MBC, dan MFC Ekstrak

Penghambatan ekstrak etil asetat kulit melinjo merah lebih efektif pada bakteri Gram positif (*B. cereus*) dibandingkan Gram negatif (*E. coli*, dan *P. aeruginosa*) (Tabel 1). Hal ini disebabkan karena membran luar bakteri Gram negati menghambat komponen antimikroba berdifusi ke dalam membran peptidoglikan dan sel bakteri (Baurain *et al.*, 2016; Parhusip & Sitanggang, 2011).

Ekstrak etil asetat kulit melinjo memiliki nilai MIC dan MBC terhadap bakteri *P. aeruginosa* sebesar 1,36 dan 5,43%, lebih besar dibandingkan nilai MIC dan MBC yang diperoleh. Semakin banyak komponen antimikroba pada tumbuhan, maka nilai MIC dan MBC akan semakin rendah. Semakin rendah nilai MIC dan MBC menunjukkan bahwa komponen tersebut memiliki daya hambat yang besar.

Tabel 1. Nilai MIC, MBC, dan MFC ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terhadap 4 jenis mikroba

Mikroba	MIC (%)	MBC (%)	MFC (%)
<i>E. coli</i>	0,69	2,76	-
<i>B. cereus</i>	0,50	2,00	-
<i>P. aeruginosa</i>	0,67	2,68	-
<i>R. oligosporus</i>	-	-	0

Tabel 2. Hasil analisis kualitatif fitokimia ekstrak etil asetat kulit melinjo merah

Uji Fitokimia	Hasil Analisis
Alkaloid	+
Saponin	+
Tanin	-
Fenolik	+
Flavonoid	+
Triterpenoid	-
Steroid	-
Glikosida	+

Keterangan: + = ada; - = tidak ada

Analisis Kualitatif Komponen Fitokimia Ekstrak

Hasil analisis komponen fitokimia ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2. Analisis komponen fitokimia secara kualitatif pada ekstrak etil asetat kulit melinjo merah menunjukkan hasil positif terhadap alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, dan glikosida. Keberadaan komponen-komponen tersebut

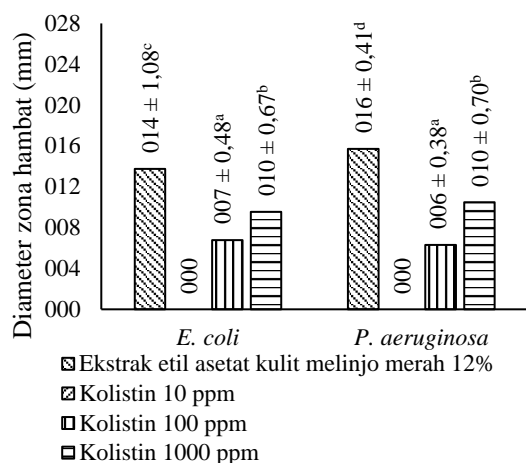
menunjukkan bahwa etil asetat mampu mengekstrak berdasarkan polaritasnya. Menurut Widyawati *et al.* (2014), etil asetat merupakan pelarut semipolar yang dapat mengekstrak komponen alkaloid, aglikon, glikosida, sterol, terpenoid, dan flavonoid.

Perbandingan Ekstrak Terpilih dengan Antibiotik

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) diameter zona hambat antibiotik kolistin konsentrasi 1000 ppm dengan ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih (12%) (Gambar 3). Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah memiliki diameter zona hambat 1,44 kali lebih besar dibandingkan antibiotik kolistin pada konsentrasi 1000 ppm terhadap bakteri *E. coli*, dan 1,50 kali lebih besar terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Secara keseluruhan, diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah 1,47 kali lebih besar dibandingkan antibiotik kolistin pada konsentrasi 1000 ppm.

Kolistin atau polimiksin E bersifat amfifatik (memiliki bagian yang polar dan nonpolar), dan berinteraksi seperti detergen terhadap membran sel, yang dapat mengganggu struktur membran sel. Ikatan antara polipeptida kationik (kolistin) dengan lipopolisakarida anionik (membran luar sel bakteri Gram negatif) menyebabkan membran sel bakteri terganggu. Kolistin menggantikan magnesium dan kalsium (ion

yang berfungsi menstabilkan molekul lipopolisakarida) pada lipopolisakarida anionik, mengakibatkan struktur membran sel menjadi tidak stabil, permeabilitas sel meningkat, kebocoran isi sel, dan kematian sel (Conly & Johnston, 2006).

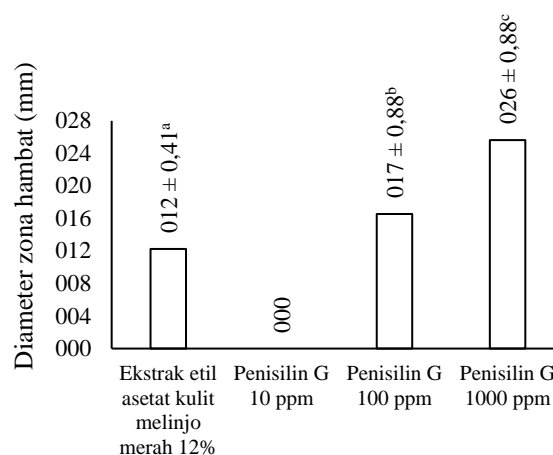


Gambar 3. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih dibandingkan dengan antibiotik kolistin

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) antara diameter zona hambat antibiotik penisilin G konsentrasi 1000 ppm dengan ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih (12%). Berdasarkan Gambar 4, diketahui bahwa ekstrak etil asetat kulit melinjo merah memiliki diameter zona hambat 0,74 kali lebih kecil dibandingkan 100 ppm antibiotik penisilin G terhadap bakteri *B. cereus*. Antibiotik Penisilin G bekerja sebagai inhibitor enzim transpeptidase, yaitu PBPs, enzim yang berfungsi untuk membuat dinding sel bakteri (Dowling *et al.*, 2017). Penisilin memiliki struktur analog berupa D-

alanyl-D-alanyl, sehingga dapat berikatan dengan enzim transpeptidase (struktur acyl-D-alanyl-D-alanyl) yang berfungsi sebagai katalis pada reaksi *cross-linking*. Hal ini akan menyebabkan fungsi PBPs terhambat, sehingga dinding sel tidak dapat terbentuk (Canzani & Aldeek, 2017).



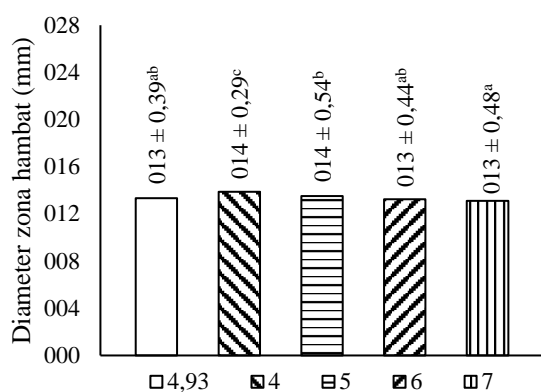
Gambar 4. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih dibandingkan dengan antibiotik Penisilin G

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Stabilitas Ekstrak Terpilih terhadap pH

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap diameter zona hambat. Berdasarkan Gambar 5 dapat dilihat bahwa pada kondisi pH 4 ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih memiliki diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan pada kondisi pH 7. Hal ini menunjukkan semakin rendah pH, maka diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah semakin besar. Hasil ini sesuai dengan penelitian Cepeda (2015), yaitu ekstrak etil asetat kulit kayu akway memiliki diameter zona hambat yang

lebih besar pada pH 4 dibandingkan pH 7. Menurut Ray (2001), kondisi asam dapat menurunkan pH sitoplasma sel bakteri, sehingga dapat mengganggu aktivitas enzim dalam sel, dan transportasi nutrisi melalui membran sel. Alakomi (2000) menambahkan, asam dapat menyebabkan kerusakan membran luar sel dan senyawa antibakteri yang bersifat hidrofobik lebih mudah berpenetrasi ke dalam sel.



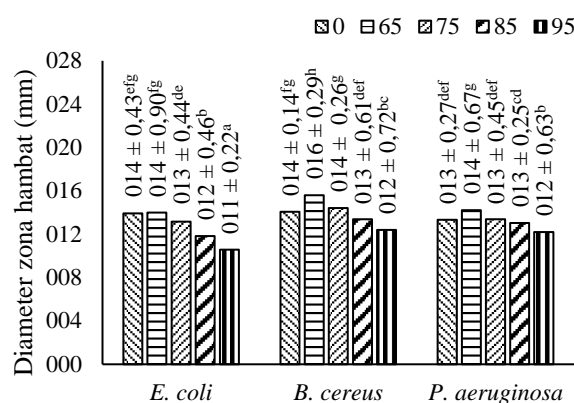
Gambar 5. Rata-rata diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih pada berbagai pH terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa*

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Stabilitas Ekstrak Terpilih pada Suhu Pemanasan

Hasil analisis menunjukkan bahwa interaksi antara jenis bakteri dan suhu pemanasan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap diameter zona hambat. Gambar 6 menunjukkan diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah pada berbagai suhu pemanasan. Ekstrak yang dipanaskan pada suhu 65°C memiliki diameter zona hambat paling besar dibandingkan

perlakuan lain dan kontrol. Peningkatan diameter zona hambat pada suhu 65°C kemungkinan karena kandungan flavonoid menjadi aktif hingga pemanasan pada suhu 70°C (Jahan *et al.*, 2015). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian, di mana pemanasan pada suhu 75, 85, dan 95°C akan merusak struktur komponen aktif, sehingga penghambatan akan cenderung menurun.



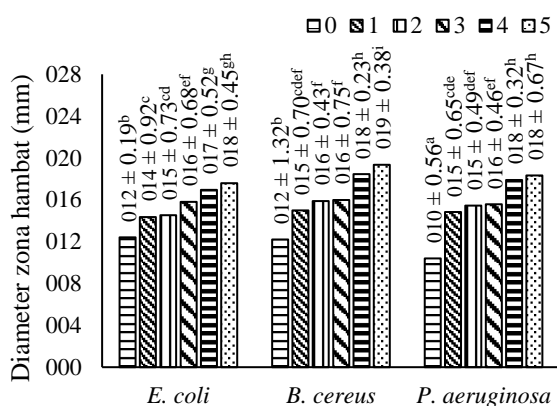
Gambar 6. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* pada berbagai suhu pemanasan

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Ekstrak yang dipanaskan pada suhu 95°C memiliki diameter zona hambat paling kecil, yang menandakan adanya kerusakan komponen antimikroba. Hasil ini sesuai dengan penelitian Kim *et al.* (2002), di mana ekstrak bawang putih yang dipanaskan pada suhu 100°C tidak memiliki diameter zona hambat dibandingkan dengan ekstrak yang dipanaskan pada suhu 65°C. Settharaksa *et al.* (2012) menyatakan bahwa semakin tinggi suhu pemanasan, maka komponen flavonoid akan semakin rusak.

Stabilitas Ekstrak Terpilih terhadap Konsentrasi Garam

Hasil penelitian membuktikan interaksi antara jenis mikroba dengan konsentrasi garam berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap diameter zona hambat. Gambar 7 menunjukkan diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* pada berbagai konsentrasi garam. Terdapat sinergisme ekstrak etil asetat kulit melinjo merah dengan konsentrasi garam.



Gambar 7. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* pada berbagai konsentrasi garam (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%)

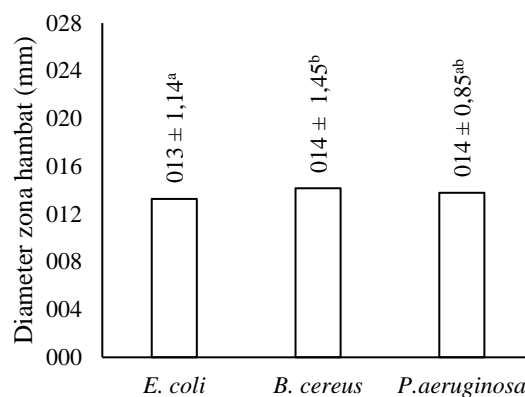
Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Amalia (2016) menyatakan bahwa garam memiliki sifat bakterisid (daya membunuh) dan bakteriostatik (daya menghambat). Garam akan menghambat kegiatan bakteriologis dan enzimatis pada mikroba. Garam NaCl dapat meningkatkan tekanan osmotik substrat, sehingga air di

dalam sel akan keluar, sel mengkerut, dan aktivitas mikroorganisme terhambat. Selain itu, NaCl juga dapat menyebabkan denaturasi protein. Ionisasi garam NaCl akan menghasilkan ion klor yang bersifat racun bagi mikroorganisme, dan dapat memblokir sistem pernapasannya.

Stabilitas Ekstrak Terpilih terhadap Konsentrasi Gula

Hasil penelitian menunjukkan diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terhadap bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *B. cereus* (Gambar 8).



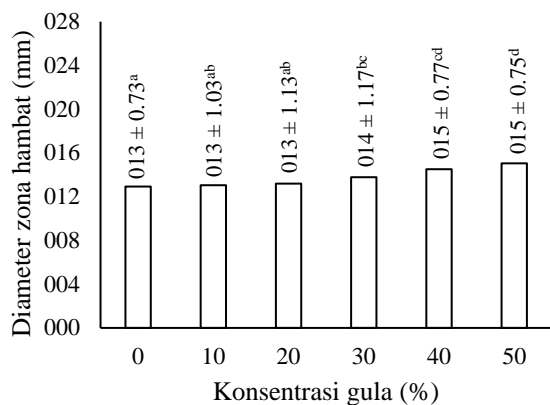
Gambar 8. Rata-rata diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* pada berbagai konsentrasi gula

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Rata-rata diameter zona hambat pada bakteri Gram negatif (*E. coli* dan *P. aeruginosa*) lebih kecil dibandingkan bakteri Gram positif (*B. cereus*). Hal ini disebabkan karena membran sel luar pada bakteri Gram negatif dapat menghambat komponen antimikroba untuk berdifusi ke dalam membran peptidoglikan dan sel

bakteri (Parhusip & Sitanggang, 2011). Adanya ikatan gula menyebabkan komponen flavonoid lebih mudah larut dalam air, sehingga fraksi etil asetat lebih mudah berdifusi dan berpenetrasi ke dinding sel bakteri *B. cereus* yang mengandung protein (polar), fosfolipid dan lipoprotein (nonpolar) (Naufalin & Rukmini, 2017).

Semakin tinggi konsentrasi gula, maka diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah semakin besar (Gambar 9). Menurut Naufalin & Herastuti (2013), larutan gula dengan konsentrasi 10% dapat meningkatkan tekanan osmotik, sehingga air di dalam sel akan keluar. Sel pun akan kekurangan air dan dapat menyebabkan kematian sel karena lisis.



Gambar 9. Rata-rata diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah pada berbagai konsentrasi gula terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa*

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Hendritomo (2003) menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi gula akan berdampak terhadap meningkatnya tekanan osmotik pada bagian luar sel, sehingga air di

dalam sel akan keluar, dan menyebabkan kematian sel karena lisis. Naufalin & Rukmini (2017) menambahkan, jika tekanan osmotik pada bagian luar sel lebih tinggi dibandingkan isi sel karena penambahan gula, maka air di dalam sel akan tertarik keluar, menyebabkan membran sitoplasma terlepas dari dinding sel (plasmolisis). Keluarnya air dari dalam sel akan menyebabkan sel menjadi berkerut.

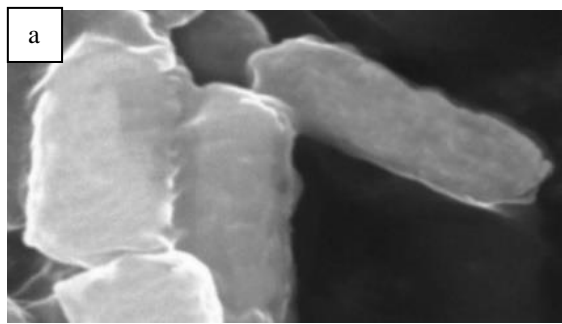
Analisis Kebocoran Ion dengan AAS

Tabel 3 menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kulit melinjo merah dapat merusak membran sel dan menyebabkan kebocoran sel pada *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa*.

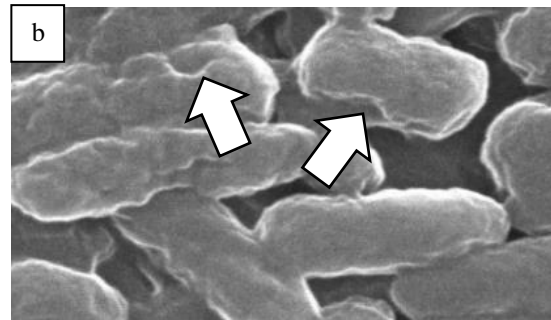
Tabel 3. Hasil analisis AAS terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* setelah mengalami kontak dengan ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih

Mikroba	Jumlah Ca ²⁺ (mg/L)	Jumlah Mg ²⁺ (mg/L)	Jumlah K ⁺ (mg/L)
<i>E. coli</i>	79,0	41,2	314
<i>B. cereus</i>	84,2	33,3	348
<i>P. aeruginosa</i>	82,0	31,3	327

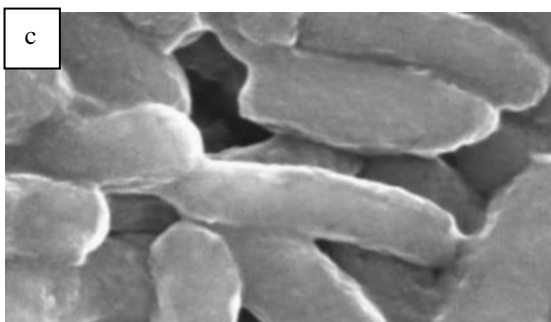
Ion-ion yang terdapat pada bakteri adalah Na⁺, K⁺, Ca²⁺, dan Mg²⁺ (Sepulveda dan Bezanilla, 2005). Ion K⁺ terdapat pada membran sitoplasma dan berperan dalam transport membran (Batt dan Tortorello, 2014). Ion Ca²⁺ berfungsi sebagai pengantar pesan, yang membawa sinyal dari permukaan ke bagian dalam sel (Dominiguez, 2004). Sementara, ion Mg²⁺ berfungsi sebagai komponen penyusun membran sel (Brown, 2010).



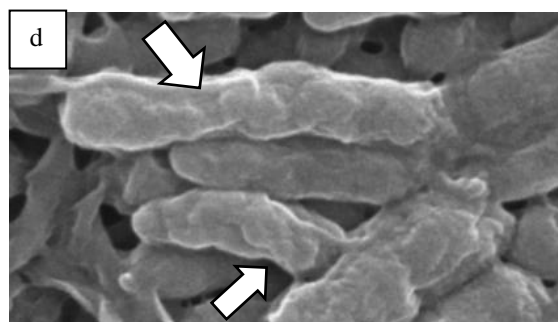
Perbesaran : 40.000x
Bentuk : batang
Kondisi : normal (permukaan halus)



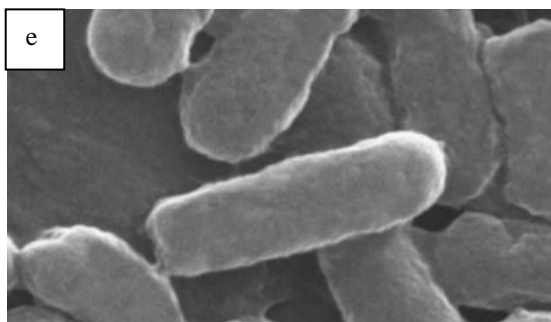
Perbesaran : 40.000x
Bentuk : batang
Kondisi : berkerut dan bengkak



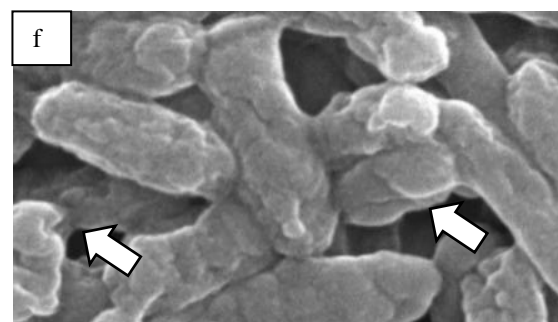
Perbesaran : 40.000x
Bentuk : batang
Kondisi : normal (permukaan halus)



Perbesaran : 40.000x
Bentuk : batang
Kondisi : berkerut, bengkak, dan terjadi elongasi



Perbesaran : 40.000x
Bentuk : batang
Kondisi : normal (permukaan halus)



Perbesaran : 40.000x
Bentuk : batang
Kondisi : berkerut dan bengkak

Keterangan:

Bakteri *E. coli* sebelum (a) dan sesudah (b) mengalami kontak dengan ekstrak

Bakteri *B. cereus* sebelum (c) dan sesudah (d) mengalami kontak dengan ekstrak

Bakteri *P. aeruginosa* sebelum (e) dan sesudah (f) mengalami kontak dengan ekstrak

Gambar 10. Hasil analisis SEM pada bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* sebelum dan sesudah mengalami kontak dengan ekstrak etil asetat kulit melinjo merah

Analisis SEM

Sel bakteri sebelum mengalami kontak dengan ekstrak etil asetat kulit melinjo

merah memiliki bentuk sel yang tampak normal, dengan permukaan yang halus (Gambar 10a, 10c, dan 10e). Namun, setelah

mengalami kontak dengan ekstrak selama 24 jam, terjadi kerusakan pada sel. Kerusakan tersebut meliputi pengkerutan sel, pembengkakan sel, permukaan sel yang cenderung kasar, bentuk tidak beraturan (Gambar 10b, 10d, dan 10f), dan terjadi elongasi (10d). Kerusakan morfologi sel bakteri didukung pula dengan hasil analisis AAS pada Tabel 3, yang menunjukkan terjadinya kebocoran sel sehingga ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan K^+ keluar dari bakteri yang sudah mengalami kontak dengan ekstrak.

Pada bakteri *E. coli* dan *P. aeruginosa*, hanya terjadi pengkerutan dan pembengkakan sel setelah mengalami kontak dengan ekstrak (Gambar 10b dan 10f). Namun, pada bakteri *B. cereus* terjadi pengkerutan, pembengkakan, dan elongasi sel setelah mengalami kontak dengan ekstrak (Gambar 10d). Pengkerutan sel bakteri dapat dikarenakan komponen antimikroba yang masuk akibat meningkatnya permeabilitas membran sel, dan merusak struktur membran sel. Komponen-komponen fitokimia yang terkandung dalam ekstrak yang menyebabkan kerusakan membran sel adalah alkaloid (Hendriko et al., 2024), Darsana et al., 2012), saponin (Harborne, 2006), fenolik (Char et al., 2010), dan flavonoid (Nuria et al., 2009). Menurut Octavia (2010), sel bakteri yang mengkerut disebabkan oleh adanya perbedaan tekanan

osmotik, menyebabkan cairan sitoplasma dalam sel keluar, sehingga sel mengalami krenasi (pengkerutan sel). Sementara, bentuk sel bakteri yang mengalami perubahan disebabkan oleh ekstrak etil asetat kulit melinjo merah yang berpenetrasi dan menyebabkan pembengkakan pada sel bakteri (Hendriko et al., 2024).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kulit melinjo merah dapat menghambat bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa*, namun tidak dapat menghambat kapang *R. oligosporus*. Rata-rata diameter zona hambat ekstrak etil asetat kulit melinjo merah dengan konsentrasi 4, 8, 12, dan 16% terhadap bakteri *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* berturut-turut adalah 10,74 mm, 11,70 mm, dan 11,27 mm. Nilai MIC ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terhadap *E. coli*, *B. cereus*, dan *P. aeruginosa* berturut-turut adalah 0,69%, 0,50%, dan 0,67%. Sementara, nilai MBC berturut-turut adalah 2,76%, 2,00%, dan 2,68%. Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah dengan konsentrasi 12% terpilih untuk digunakan pada penelitian selanjutnya. Komponen fitokimia yang terdapat pada ekstrak etil asetat kulit melinjo merah adalah alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, dan glikosida, Kelima komponen tersebut memiliki sifat antimikroba.

Aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terpilih (12%) terhadap antibiotik kolistin (1000 ppm) 1,47 kali lebih besar, sementara dengan penisilin G (100 ppm) 0,74 kali lebih kecil. Ekstrak etil asetat kulit melinjo merah terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar pada pH 4 dibandingkan pH 7. Pemanasan pada suhu 65°C akan meningkatkan aktivitas antibakteri, namun pada suhu 75, 85, dan 95°C komponen fitokimia akan rusak, sehingga diameter zona hambatnya semakin kecil. Penambahan garam hingga 5% dan gula hingga 50% terbukti dapat meningkatkan aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat kulit melinjo merah.

Hasil pengujian AAS menunjukkan bahwa bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *B. cereus* mengalami kebocoran sel setelah mengalami kontak dengan ekstrak etil asetat kulit melinjo merah. Ion-ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan K^+ terlepas dari membran sel bakteri. Akibat kontak ekstrak terpilih dengan bakteri, menyebabkan kerusakan yang dibuktikan dengan analisis SEM, di mana terjadi pengkerutan, pembengkakan, elongasi dan permukaan sel menjadi tidak rata.

SARAN

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah untuk melakukan pengujian fitokimia secara kuantitatif, sehingga dapat diketahui kadar

alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, dan alkaloid. Dalam pengujian stabilitas terhadap suhu pemanasan, perlakuan suhu dan waktu pemanasan dapat ditambahkan. Selain itu, diperlukan pengujian melinjo secara *in vivo* terhadap hewan percobaan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan (B218), Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kalla, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membran. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
- Amalia, Dwiyantri, R. D., & Haitami. (2016). Daya hambat NaCl terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Medical Laboratory Technology Journal*, 2(2), 42-45.
<https://doi.org/10.31964/mltj.v2i2.125>
- Ardiansyah. (2002). *Kajian aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas (Plucea indica L.)* [Master's Thesis]. Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia.
- Ardiansyah, Nuraida, L., & Andarwulan, N. (2003). Aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas (*Plucea indica L.*) dan stabilitas aktivitasnya pada

- berbagai konsentrasi garam dan tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 14(2), 90-97.
- Asmara, A. P. (2017). Uji fitokimia senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak metanol bunga turi merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers). *Jurnal Al-Kimia*, 5(1), 48-59. <https://doi.org/10.24252/al-kimia.v5i1.2856>
- Baurain, D., Wilmotte, A., & Frere, J. (2016). Gram-negative bacteria: “inner” vs. “cytoplasmic” or “plasma membrane”: a question of clarity rather than vocabulary. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 8(4), 325-326. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000305>
- Badan Pusat Statistik. (2015). *Statistik Tanaman Buah-buahan dan Sayuran Tahunan*. Badan Pusat Statistik, Jakarta.
- Canzani, D., & Aldeek, F. (2017). Penicillin G's function, metabolites, allergy, and resistance. *Journal of Nutrition and Human Health*, 1(1), 28-40. <https://doi.org/10.35841/nutrition-human-health.1.1.28-40>
- Cepeda, G. N., Lisangan, M. M., & Silamba, I. (2015). Aktivitas antibakteri ekstrak kulit kayu akway (*Drimys piperita* Hook f.) terhadap bakteri patogen. *Agritech*, 35(2), 170-177. <https://doi.org/10.22146/agritech.9403>
- Conly, J. M., & Johnston, B. L. (2006). Colistin: The phoenix arises. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), 267-269. <https://doi.org/10.1155/2006/901873>
- de Lira Mota, K. S., de Oliveira Pereira, F., de Oliveira, W. A., Lima, I. O., & de Oliveira Lima, E. (2012). Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with ergosterol. *Molecules*, 17(12), 14418-14433. <https://doi.org/10.3390/molecules171214418>
- Dewi, C., Utami, R., & Parnanto, N. H. R. (2012). Aktivitas antioksidan dan antimikroba ekstrak melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, 5(2), 74-81.
- Dowling, A., Dwyer, J. O., & Adley, C. C. (2017). Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. In Mendez-Vilaz, A. (Ed.), *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* (pp. 536-545). Formatex Research Center.
- Ergina, Nuryanti, S., & Pursitasari, I. D. (2014). Uji kualitatif senyawa metabolit sekunder pada daun palado (*Agave angustifolia*) yang diekstraksi dengan pelarut air dan etanol. *Jurnal Akademika Kimia*, 4(3), 165-172.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Hendritomo, H. I. (2003). Perubahan mutu kecap skala industri rumah tangga selama tiga bulan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 14(3).
- Hendriko, A., Parhusip, A. J. N., Juwono, A. L., Budiman, I., & Natalie, B. (2024). Mechanism and stability of antimicrobial activity of *Zingiber*

- cassumunar* Roxb. rhizome extract against foodborne pathogenic microorganisms. *Food Biophysics*. <https://doi.org/10.1007/s11483-024-09841-x>
- Jahan, N., Islam, M. A. Alam, F., Gan, S. H., & Khalil, M. I. (2015). Prolonged heating of honey increases its antioxidant potential but decreases its antimicrobial activity. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(4), 134-144. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v12i4.20>
- Kato E., Tokunaga Y., & Sakan F. (2009). Stilbenoids isolated from the seeds of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2544-2549. <https://doi.org/10.1021/jf803077p>
- Kim, J. Y., Lee, Y. C., & Kim, K. S. (2002). Effect of heat treatments on the antimicrobial activities of garlic (*Allium sativum*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(2), 331-335.
- Misna, & Diana, K. (2016). Aktivitas antibakteri ekstrak kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Galenika*, 2(2), 138-144. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2016.v2.i2.5990>
- Naufalin, R., & Herastuti, S. R. (2013). Microcapsule application of kecombrang flower extract: Effect of concentration, type of fraction, pH of medium and NaCl on microbiological properties of minced beef. *Animal Production*, 15(1), 8-14.
- Naufalin, R., & Rukmini, H. S. (2017). Antibacterial activity of kecombrang flower extract (*Nicolaia speciosa*) microencapsulation with food additive materials formulation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102, 012035. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012035>
- Octavia, J. (2010). Analisis kerusakan sel mikroba patogen akibat aktivitas antimikroba ekstrak biji dan kulit melinjo (*Gnetum gnemon* L.) [Bachelor's Thesis]. Universitas Pelita Harapan, Karawaci, Indonesia.
- Parhusip, A. J. N., & Sitanggang, A. B. (2011). Antimicrobial activity of melinjo seed and peel extract (*Gnetum gnemon*) against selected pathogenic bacteria. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 5(3), 103-112. <https://doi.org/10.5454/mi.5.3.2>
- Ray, B. (2001). *Fundamental food microbiology*. (2nd ed.). CRC Press.
- Settharaksa, S., Jongjareonrak, A., Hmadhlu, P., Chansuwan, W., & Siripongvutikorn, S. (2012). Flavonoid, phenolic contents and antioxidant properties of thai hot curry paste extract and its ingredients as affected of pH, solvent types and high temperature. *International Food Research Journal*, 19(4), 1581-1587.
- Siregar, T. M., Cornelia, M. Ermiziar, T., & Saragih, R. (2009). Studi kandungan karotenoid, vitamin C dan aktivitas antioksidan kulit melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Prosiding Seminar Nasional PATPI. Jakarta, Indonesia.

- Syafitri, N. E., Bintang, M., & Falah, S. (2014). Kandungan fitokimia, total fenol, dan total flavonoid ekstrak buah harendong (*Melastoma affine* D. Don). *Current Biochemistry*, 1(3), 105-115.
- Tamilselvi, N., Krishnamoorthy, P., Dharmotharan, R., Arumugam, P., & Sagadevan, E. (2012). Analysis of total phenols, total tannins and screening of phytochemicals in *Indigofera aspalathoides* (Shivanar Vembu) Vahl EX DC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(6), 3259-3262.
- Widyasanti, A., Priantiwi, A. M., & Rohdiana, D. (2016). Aktivitas antibakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae* ekstrak teh putih dalam variasi jenis pelarut. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*, 1(19), 41-56.
- Widyawati, P. S., Budianta, T. D. W., Kusuma, F. A., & Wijaya, E. L. (2014). Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* Less leaves extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 850-855. <https://doi.org/10.22302/pptk.jur.jptk.v19i1.81>
- Yanuhar, U. (2016). *Mikroalga laut Nannochloropsis oculata*. UB Press.