

Selain sebagai makanan alternatif, manfaat melinjo telah ditemukan oleh para ahli biologi dan kesehatan. Melinjo diketahui mengandung senyawa antioksidan yang cukup tinggi, sehingga sangat reaktif terhadap radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit. Selain itu melinjo juga berpotensi sebagai antimikroba alami yang artinya melinjo dapat dipakai sebagai pengawet alami makanan sekaligus obat untuk penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Akan tetapi disisi lain melinjo juga mengandung kadar purin yang cukup tinggi, sehingga sangat berpotensi menyebabkan penyakit asam urat (Kato, *et al.* 2007).

Buah melinjo sudah banyak digunakan untuk membuat emping, tepung dan sayuran, tetapi kulit buah melinjo yang jumlahnya cukup banyak sampai saat ini masih belum dimanfaatkan secara optimal. Dari komposisinya, kulit dan buah melinjo mengandung karotenoid (provitamin A) sebanyak 1000 SI dan vitamin C sebanyak 100 mg, sehingga diduga pada kulit buah melinjo banyak mengandung karotenoid dan Vitamin C. Beberapa senyawa yang bersifat sebagai antibakteri diantaranya adalah xanon, saponin, tannin, steroid dan flavonoid. Dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi terhadap kulit buah melinjo dengan metoda perendaman didalam pelarut etanol (Melani, *et al.* 2009).

Escherichia coli merupakan bakteri yang *anaerob fakultatif* dan merupakan anggota golongan koliform yang termostabil. *Escherichia coli* dianggap sebagai kuman yang tidak pathogen dalam saluran pencernaan dan baru pathogen apabila berada di luar saluran pencernaan (Jawet, Ernest, 1995). Bakteri *Escherichia coli* adalah suatu bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya kontaminasi feces dan kondisi sanitasi yang tidak baik terhadap air, makanan dan minuman.

Penelitian ini dilakukan untuk melihat konsentrasi yang terbentuk dari ekstrak kulit buah melinjo yang memiliki daya aktivitas antimikroba yang paling luas diameter zona penumbuhannya terhadap bakteri pathogen gram negatif *Escherichia coli* yang dilakukan dengan metode difusi cakram, sehingga dari hasil penelitian ini dapat diketahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari sampel.

METODA PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit lunak buah melinjo, bakteri *Escherichia coli*, etanol 96%, media (Mueller Hinton) MH, NaCl fisiologis, distilat, barium klorida 1% (BaCl_2), Asam sulfat 1% (H_2SO_4).

Untuk ekstraksi kulit buah melinjo digunakan metode maserasi, kulit buah melinjo telah dikumpulkan, dicuci bersih, lalu dipotong kecil-kecil, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari. Kulit buah melinjo yang telah kering sebanyak 0,5 kg dimaserasi menggunakan pelarut etanol 95% selama 3 hari pada suhu ruangan, kemudian dilakukan maserasi sebanyak 2 kali. Maserasi yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator (Eyela) pada suhu 40°C , sehingga diperoleh kulit melinjo kental.

Untuk pembuatan media MH, tambahkan sebanyak 1,14 gram media MH fisiologis ke dalam 100 ml aquadest, kemudian dipanaskan sampai mendidih sampai seluruhnya larut. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf. Komposisi media MH yaitu ekstrak daging 2 gram, hidrolisis asam dari kasein 17,5 gram, pati 1,5 gram, agar 17 gram.

Untuk pembuatan larutan Mac Farland, adalah dengan mencampurkan kedua larutan asam sulfat 1 %b/v 9,5 ml dan larutan barium klorida v/v 0,5 ml ke dalam tabung kemudian dikocok dan dihomogenkan. Apabila kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan suspensi standart, berarti konsentrasi suspensi bakteri adalah 10⁸ U/ml.

Untuk pembuatan NaCl fisiologis, dilakukan dengan menimbang NaCl 0,9 gram dan memasukkan dalam erlemeyer, larutkan dengan 100 mL aquadest dan dihomogenkan.



Setelah homogen, tutup mulut tabung erlemeyer dengan kapas, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Untuk pembuatan suspensi *Escherichia coli*, dilakukan dengan membiakkan bakteri *Escherichia coli* yang telah dipermuda 24 jam, kemudian diambil satu ose dan dilarutkan dalam larutan NaCl sebanyak 2 mL sampai kekeruhannya sama dengan standar MacFarland.

Langkah selanjutnya adalah pengujian antimikroba dengan ekstrak kulit buah melinjo dengan metode difusi cakram, yang dilakukan dengan langkah-langkah berikut: ambil kertas cakram dengan diameter 4 mm dari kertas saring yang dipotong dengan pelubang kertas, dimasukkan dalam cairan ekstrak sesuai dengan konsentrasi masing-masing dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya kertas cakram dikeluarkan dari cairan ekstrak dan dikeringkan pada suhu sekitar 50°C, sehingga cairan tidak menetes. Langkah berikutnya, tuangkan media MH yang telah disterilkan kedalam petridish hingga merata, kemudian biarkan sampai membeku. Selanjutnya, suspensi bakteri *Escherichia coli* yang sudah di standarisasi kekeruhannya, kemudian celupkan kapas lidi steril, dan tunggu sebentar agar cairan meresap ke dalam kapas. Kemudian lidi diangkat dan diperas dengan cara menekan lidi pada dinding tabung bagian dalam sambil di putar-putar. Digores-goreskan kapas lidi pada permukaan media MH, sehingga seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan. Biarkan media MH selama 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam agar. Kemudian cakram tersebut diletakkan dalam MH agar yang telah ditanam bakteri. Langkah berikutnya dilakukan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Aktifitas antimikroba terbesar ditunjukkan oleh luas diameter zona bening terbesar yang terbentuk dari konsentrasi tersebut. Konsentrasi terkecil dari sampel yang mampu menghambat bakteri yang diinokulasikan dengan terbentuknya zona bening merupakan nilai konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari sampel tersebut.

Untuk pewarnaan gram, dilakukan dengan cara mengoleskan koloni bakteri ke atas kaca preparat yang telah ditetesi NaCl, kemudian olesan tersebut difiksasi. Setelah olesan kering selanjutnya ditetesi larutan Kristal violet dan dibiarkan selama 3 menit. Setelah itu ditetesi larutan lugol dan dibiarkan selama 60 detik. Olesan kemudian dicuci dengan gelas aquadest, dan digoyang-goyang selama 1 menit. Setelah bersih, kaca preparat dibilas dengan gelas aquadest, dan dikeringkan, kemudian ditetesi dengan larutan safranin dan tunggu selama 3 menit. Tahap selanjutnya adalah mencuci kaca preparat dengan aquadest lalu keringkan dan diamati di bawah mikroskop.

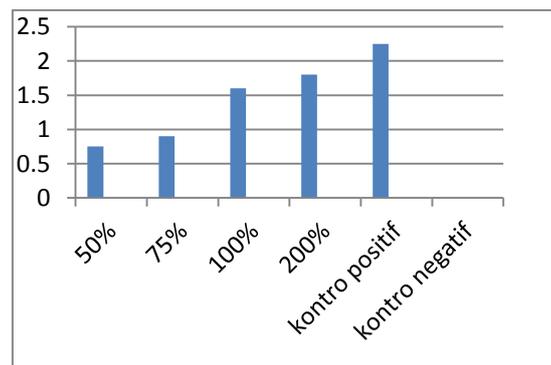
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan konsentrasi 50% memiliki aktivitas antimikroba 0,75 cm, 75% memiliki aktivitas antimikroba 0,9 cm, 100% memiliki aktivitas antimikroba 1,6 cm, 200 % memiliki aktivitas antimikroba 1,8 cm, untuk kontrol positif (amoxilin) memiliki aktivitas antimikroba 2,25 cm dan kontrol negatif (cakram tanpa melinjo) tidak memiliki aktivitas antimikroba. Kontrol positif (amoxilin) memberikan aktifitas antimikroba terbesar karena amoxilin merupakan antibiotic, sedangkan kontrol negative tidak memberikan akvitas antimikroba, karena di dalam sampel tersebut tidak mengandung antimikroba.



Tabel 1. Hasil sensitifitas ekstrak kulit buah melinjo terhadap bakteri *Eschericia coli*

Konsentrasi	Media		Jml	Rata – Rata
	1 (mm)	2 (mm)		
50%	0,6	0,9	1,5	0,75
75%	0,8	1,0	1,8	0,9
100%	1,5	1,7	3,2	1,6
200%	1,7	1,9	3,6	1,8
Kontrol Positif	2,2	2,3	4,5	2,25
Kontrol Negatif	0	0	0	0

Gambar 1. Diagram Aktifitas antimikroba ekstrak kulit buah melinjo terhadap bakteri *Eschericia coli*

Dari Gambar 1 di atas dapat dilihat bahwa konsentrasi yang memiliki daya aktivitas antimikroba yang paling tinggi terhadap bakteri pathogen gram negatif *Eschericia coli* yaitu konsentrasi 50%. Karena dengan penambahan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu konsentrasi 75%, 100% dan 200% tidak memberikan aktivitas antimikroba sesuai dengan penambahan konsentrasi yang diberikan. Penambahan konsentrasi tidak menghasilkan peningkatan aktivitas antimikroba yang signifikan.

Kulit buah melinjo yang telah dikumpulkan berasal dari 6 kg buah melinjo, setelah melinjo dipisahkan dari bijinya, didapatkan kulit melinjo sebanyak 2 kg, kemudian sampai bersih, lalu dipotong kecil-kecil selanjutnya dijemur di bawah sinar matahari. Hasil penjemuran kulit melinjo didapatkan sebanyak 0,5 kg kulit melinjo kering. Kulit melinjo kering dimaserasi menggunakan pelarut etanol sebanyak 95% selama 3 hari di dalam ruang, remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Hasil maserasi didapatkan sebanyak 5 L, dan di ekstrak menggunakan rotary evaporator (Eyela) pada suhu 40°C, sehingga diperoleh ekstrak kulit melinjo kental sebanyak 43,4 gram.

Metode yang digunakan yaitu metode difusi cakram, dengan menginokulasi pelat agar dengan biakan dan membiarkan zat yang memiliki potensi antimikroba berdifusi ke dalam agar. Cakram yang telah mengandung zat antibakteri diletakkan di permukaan pelat agar yang mengandung organisme yang diuji. Konsentrasi menurun sebanding dengan luas area difusi. Pada jarak tertentu pada cakram, antibakteri berdifusi sampai pada titik zat antibakteri tersebut tidak lagi menghambat pertumbuhan mikroba. Efektivitas zat antibakteri ditunjukkan oleh zona hambat. Zona hambat tampak sebagai area jernih atau bening yang mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas antibakteri terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris.

Untuk melakukan pengujian aktivitas antibakteri digunakan ekstrak etanol kulit buah melinjo, yang terlebih dahulu dicuci sampai bersih dan dipotong kecil-kecil. Proses



pengecilan ukuran kulit melinjo bertujuan agar pori-pori dan jaringan kulit melinjo terbuka sebanyak mungkin, sehingga proses ekstraksi menjadi cepat. Kulit buah melinjo yang telah dipotong lalu di jemur sampai kering kemudian direndam dengan etanol 96% selama 3 x 24 jam yang disebut dengan maserasi. Penggunaan pelarut etanol karena etanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam dan hampir dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder, bersifat polar, universal dan mudah didapat. Metode maserasi dipilih karena maserasi tidak menggunakan suhu tinggi, sehingga tidak merusak senyawa yang terkandung pada kulit buah melinjo. Maserasi juga terhindar dari cahaya/ penerangan, sehingga prosesnya dapat berlangsung efektif. Ekstrak dingin memungkinkan banyak senyawa yang tertarik (Amiarsi Yulianaingsih & Sabari,2006). Maserat yang diperoleh kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya menggunakan rotary evaporator (Eyela) pada suhu 40°C, sehingga diperoleh ekstrak kental (Sukatta *et al.*, 2008). Proses penyaringan bertujuan untuk memisahkan antara ampas kulit melinjo dengan filtratnya. Penggunaan rotary evaporator (Eyela) karena mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih, sehingga kandungan kimia kulit buah melinjo tidak rusak oleh suhu tinggi (Pangestu & Handayani,2011).

Media yang digunakan yaitu media Mueller Hinton (MH). Pada penelitian ini digunakan MH agar, karena media ini telah direkomendasikan oleh FDA dan WHO untuk tes antibakteri terutama bakteri aerob dan facultative anaerobik bakteri untuk makanan dan materi klinis. Media agar ini juga telah terbukti memberikan hasil yang baik dan reproduksibel (reproducibility). Media agar ini mengandung sulfonamida, trimethoprim, dan inhibitor tetrasiklin yang rendah serta memberikan pertumbuhan pathogen yang memuaskan. Dalam penelitian ini dipilih media MH agar dengan alasan pengujian berdasarkan prinsip penghitungan zona hambatan menggunakan kertas cakram.

Sebelum membuat suspensi bakteri terlebih dahulu dibuat larutan Mac Farland sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri yang akan dibuat, selanjutnya dibuat larutan NaCl 0,9%. Bakteri *Escherichia coli* yang telah dipermuda 24 jam, diambil satu ose dan dilarutkan dalam larutan NaCl sampai kekeruhannya sama dengan standar Mac Farland.

Kertas cakram dengan diameter 4 mm dari kertas saring dipotong dengan pelubang kemudian masukkan ke dalam cairan ekstrak sesuai dengan konsentrasi masing-masing, yaitu konsentrasi 50%, 75%, 100% ,200%, kontrol positif (amoxilin) dan kontrol negatif (cakram tanda ekstrak melinjo) didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya kertas cakram dikeluarkan dari cairan ekstrak dan dikeringkan pada suhu sekitar 50°C, sehingga tidak menetes. Metoda difusi cakram dipilih karena dengan cara ini mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik dan waktu pengerjaannya tidak

Selanjutnya, suspensi bakteri *Escherichia coli* yang sudah di standarisasi kekeruhannya, dicelupkan ke dalam kapas lidi steril, ditunggu sebentar agar cairan tersebut meresap ke dalam kapas. Kemudian lidi diangkat dan diperas dengan cara menekan lidi dengan dinding tabung bagian dalam sambil di putar-putar. Digores-goreskan kapas lidi pada cakram media *nutrient agar*, sehingga seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan. Media MHA dibiarkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam cakram agar. Kemudian cakram tersebut diletakkan dalam media *nutrient agar* yang telah ditanam bakteri. Langkah selanjutnya dilakukan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Metoda gores dipilih karena metoda ini praktis dan diharapkan agar suspensi bakteri ditanam merata pada media MH.

Dari hasil aktifitas antimikroba terbesar ditunjukkan oleh luas diameter zona bening terbesar yang terbentuk dari konsentrasi tersebut, yaitu konsentrasi 50%. Karena dengan penambahan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu konsentrasi 75%, 100% dan 200% tidak memberikan aktivitas antimikroba sesuai dengan penambahan konsentrasi yang diberikan.

penambahan konsentrasi tidak menghasilkan peningkatan aktivitas antimikroba yang signifikan. Kontrol positif (amoxilin) memberikan aktifitas antimikroba terbesar karena amoxilin merupakan antibiotik. Sedangkan kontrol negatif (cakram tanda ekstrak melinjo) tidak memberikan akvtas antimikroba, karena di dalam cakram tersebut tidak mengandung antimikroba. Zona bening yang terbentuk karena reaksi antara zat antimikroba pada ekstrak kulit melinjo dengan cara inaktivasi enzim esensial dan destruksi atau inaktivasi fungsi dari material genetic (Brannen,L,A& P.M. Davidson,1993).

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang mempunyai kecenderungan untuk mengikat protein, sehingga mengganggu proses metabolisme (Ganiswara,GS.1995). Flavonoid diberikan pada suatu golongan besar senyawa yang berasal dari kelompok senyawa yang paling umum yaitu senyawa flavon. Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa 1,3 diaril propane, senyawa isoflavonoid adalah senyawa 1,2 diaril propane, sedangkan senyawa-senyawa neoflavonoid adalah 1,1 diaril propane.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa: ekstrak kulit buah melinjo memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri pathogen gram negatif *Escherichia coli*; konsentrasi memiliki daya aktivitas antimikroba yang paling tinggi terhadap bakteri pathogen gram negatif *Escherichia coli* dengan konsentrasi 50%. Karena dengan penambahan konsentrasi yang lebih tinggi, tidak mendapatkan aktivitas antimikroba sesuai dengan penambahan konsentrasi yang diberikan; dan penambahan konsentrasi tidak menghasilkan peningkatan aktivitas antimikroba yang signifikan.

Untuk peneliti selanjutnya disarankan untuk menggunakan metode lain dalam menentukan aktivitas antimikroba, seperti metoda silinder, sumuran, turbidimetri maupun metoda dilusi. Dengan tujuan agar peneliti berikutnya dapat membandingkan hasil dari metoda-metoda tersebut dan didapatkan metoda yang paling efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Amriani, D. et al. 2006. *Pengaruh Jenis dan Perbandingan Pelarut terhadap Hasil Ekstraksi Minyak Atsiri Mawar*. In J.Hort 16(4): 356-359.
- Brannen, L.A. dan Davidson, P.M. 1993. *Antimicrobials in Food*. Edisi kedua. New York, Marcel Dekker Inc. p. 95-124.
- Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI 2008. *Inventarisasi Tanaman Obat Indonesia 1 jilid 1*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Ganiswara S. G, 1995, *Farmakologi dan Terapi* 4, Universitas Indonesia Fakultas Kedokteran, Jakarta.
- Harahap, E., Tokunaga, Y., Sakan, F. (2007). *Stilbenoids Isolated from the Seeds of Melinjo (Gnetum gnemon L.) and Their Biological Activity*. Japan. J.Agric Food Chem.
- Harahap, E. 2007. Uji Aktivitas In Vitro Levofloksasin Terhadap Isolat *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Resistensi Multiobat Di RSUD Soetomo Surabaya: Isolat dari Pasien Infeksi Kulit dan Infeksi Saluran Kemih. [Skripsi], rFakultas Kedokteran UNAIR Surabaya.
- Harahap, E., Cornelia, Tagor M.Siregar, Ermiziar, 2009. Studi Kandungan Carotenoid, vitamin C dan Aktifitas Antioksidan Kulit Melinjo (*Gnetum Gnemon*)
- Harahap, A & Setyo Wuri Handayani. 2011. *Rotary Evaporator and Ultraviolet Lamp*.Institute Pertanian Bogor.
- Harahap, M., Naka, Y., Angkawidjaja, C., Yamaguchi, T., Matoba, T. & Takamura, H. 2010. Antioxidant and Damage Prevention Activities of the Edible Parts of *Gnetum gnemon* and Their Change upon Heat Treatment. *Journal Food Science and Technology*





Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

Wukatta, U., P. Rugthaworn, P. Pitpiangchan, dan U. Dilokkunanant. 2008. Development of Mangoesteen Anti-Acne Gel. *Kasetsart j.(Nat. Sci.)*. 42(5):163-186

Wolk, W.A., dan Wheeler, 1990. *Mikrobiologi Dasar* Jilid I Edisi kelima diterjemahkan oleh Markham. Jakarta : Erlangga