

TP6  
14  
8

11/5

**MEMPELAJARI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA  
EKSTRAK ANTARASA (*Litsea cubeba*) DAN APLIKASINYA SEBAGAI  
PENGAWET ALAMI PADA BAHAN PANGAN**

Oleh :  
**DEWI RAHMAWATI**  
F02499057



2004  
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR**

DEWI RAHMAWATI. F02499057. **Mempelajari Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Antarasa (*Litsea cubeba*) dan Aplikasinya sebagai Pengawet Alami pada Bahan Pangan.** Di bawah bimbingan Sedarnawati Yasni. 2004.

---

---

## RINGKASAN

Di Indonesia rempah-rempah banyak dimanfaatkan sebagai bumbu masakan tradisional karena selain dapat memberikan citarasa yang khas dan membangkitkan selera makan, juga berfungsi mengawetkan sehingga makanan tersebut dapat disimpan lebih lama. Hal ini diduga berkaitan dengan adanya sifat antioksidan dan antimikroba dari rempah tersebut. Antarasa (*Litsea cubeba*) merupakan salah satu jenis rempah yang banyak digunakan pada masakan khas Sumatera Utara seperti gule arsik (gulai ikan) dan naniura. Tanaman antarasa ini belum banyak dikenal oleh masyarakat sehingga belum dibudidayakan.

Dengan kemajuan teknologi, berbagai cara telah dilakukan untuk memperpanjang masa simpan bahan pangan terutama bahan pangan yang mudah rusak seperti ikan. Salah satunya dengan penambahan bahan pengawet (antioksidan dan antimikroba) sintetik. Dewasa ini penggunaan antioksidan dan antimikroba atau bahan pengawet sintetik menimbulkan kekhawatiran pada masyarakat karena efek sampingnya yang dapat membahayakan kesehatan. Hal ini mendorong banyak peneliti untuk menggali sumber antioksidan dan antimikroba alami, salah satunya dari rempah-rempah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan antimikroba rempah antarasa (*Litsea cubeba*) yang diekstrak dengan cara maserasi sehingga diharapkan dapat diaplikasikan sebagai sumber antioksidan dan antimikroba alami pada bahan pangan.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan dua metode yaitu metode tiosianat dan metode DPPH. Pada metode tiosianat aktivitas antioksidan dinyatakan dengan periode induksi, yaitu lamanya zat antioksidan untuk dapat menghambat terjadinya oksidasi pada asam linoleat. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol antarasa ternyata sedikit lebih tinggi dari  $\alpha$ -tokoferol namun masih lebih rendah dibandingkan BHT, di mana periode induksi  $\alpha$ -tokoferol, ekstrak etanol antarasa, dan BHT berturut-turut 1.34, 1.93, dan 3.14 hari.

Pada metode DPPH aktivitas antioksidan dinyatakan dengan bilangan  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) sebesar 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Hasil pengujian menunjukkan selama 5 jam penyimpanan nilai  $IC_{50}$  untuk standar (BHT dan  $\alpha$ -tokoferol) berada pada kisaran nilai kurang dari 50 ppm dan dinyatakan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Nilai  $IC_{50}$  selama penyimpanan untuk BHT antara 30.054 – 34.658 ppm dan  $\alpha$ -tokoferol 27.688 – 34.536 ppm. Minyak atsiri antarasa dinyatakan tidak memiliki aktivitas antioksidan (tidak aktif). Senyawa antioksidan sudah dinyatakan lemah jika nilai  $IC_{50}$  antara 151-200 ppm sehingga aktivitas antioksidan ekstrak etanol antarasa dengan nilai  $IC_{50}$  diatas 200 ppm dinyatakan sangat lemah atau dapat juga dinyatakan tidak aktif.

Pengujian aktivitas antimikroba dengan metode difusi sumur menunjukkan minyak atsiri antarasa dengan konsentrasi 5% (w/v) ternyata mampu menghambat semua bakteri uji (*S.aureus*, *B.cereus*, *S.Typhimurium*, dan *P. aeruginosa*) dengan diameter penghambatan terbesar pada *B. cereus* yaitu 11.86 mm. Ekstrak heksan antarasa hanya mampu menghambat *S.aureus* dan *B.cereus* dengan diameter penghambatan terbesar pada *B.cereus* 2.15 mm. Hal ini juga terjadi pada ekstrak etanol dengan diameter penghambatan terbesar pada *S.aureus* 11.11 mm. Jumlah koloni masing-masing bakteri uji pada setiap cawan antara  $10^5 - 10^6$  CFU/ml.

Untuk mengetahui konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji maka dilakukan penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Penentuan MIC hanya dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan diameter penghambatan cukup besar dalam uji aktivitas antimikroba. Hasil pengujian menunjukkan bahwa minyak atsiri antarasa memiliki nilai MIC terhadap *S.aureus* 0.5 mg/ml (0.05% w/v), pada *B.cereus* dan *S.Typhimurium* 3 mg/ml (0.3% w/v). Nilai MIC ekstrak etanol terhadap *S.aureus* dan *B.cereus* adalah 0.5 mg/ml (0.05% w/v).

Aplikasi ekstrak yang dilakukan pada potongan fillet (daging dengan kulit) ikan kakap merah menunjukkan nilai pH selama dua hari penyimpanan untuk ketiga perlakuan umumnya berkisar pada pH 6.10-7.04. Kadar TVN pada kontrol mengalami peningkatan selama penyimpanan dari 18.83 mg/100 g (hari ke-0) menjadi 21.16 mg/100 g (hari ke-2), sedangkan pada perendaman dengan minyak atsiri dan ekstrak etanol 5% (w/v) nilainya berfluktuasi antara 12.62-15.81 mg/100 g (minyak atsiri), dan 10.65-17.10 mg/100 g (ekstrak etanol). Sementara itu kadar TMA umumnya mengalami penurunan selama penyimpanan dari 12.55 menjadi 10.82 mg/100 g (kontrol), dari 11.61 menjadi 9.47 mg/100 g (rendam minyak atsiri). Kadar TMA sampel yang direndam ekstrak etanol justru mengalami peningkatan dari 8.02 menjadi 9.60 mg/100 g.

Fillet yang direndam dengan minyak atsiri dan ekstrak etanol 5% (w/v) ternyata memiliki kandungan total mikroba lebih kecil dibandingkan kontrol selama penyimpanan, walaupun kandungan total mikroba kontrol masih di bawah batas penerimaan kesegaran ikan  $5 \times 10^5$  CFU/gram (SNI 01-2729-1992). Kandungan total mikroba akhir sampai hari ke-2 penyimpanan untuk kontrol, perendaman dengan minyak atsiri 5% (w/v) dan ekstrak etanol 5% (w/v) berturut-turut adalah  $2.1 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^4$  dan  $9.7 \times 10^4$  CFU/gram. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa cukup efektif untuk diaplikasikan sebagai pengawet alami pada bahan pangan terutama berkaitan dengan daya antimikrobanya.

**MEMPELAJARI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA  
EKSTRAK ANTARASA (*Litsea cubeba*) DAN APLIKASINYA SEBAGAI  
PENGAWET ALAMI PADA BAHAN PANGAN**

**SKRIPSI**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar

**SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**

Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi

Fakultas Teknologi Pertanian

Institut Pertanian Bogor

Oleh :

**DEWI RAHMAWATI**

**F02499057**

2004

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**BOGOR**

INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

---

---

MEMPELAJARI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA  
EKSTRAK ANTARASA (*Litsea cubeba*) DAN APLIKASINYA SEBAGAI  
PENGAWET ALAMI PADA BAHAN PANGAN

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar

**SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**

Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi

Fakultas Teknologi Pertanian

Institut Pertanian Bogor

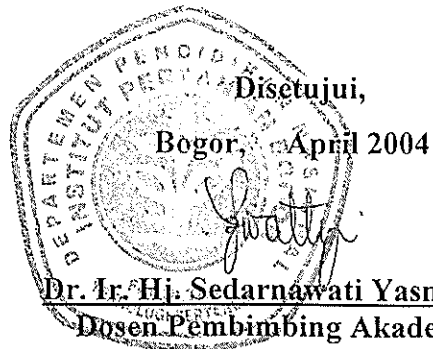
Oleh :

**DEWI RAHMAWATI**

**F02499057**

Dilahirkan di Bogor, 20 Desember 1980

Tanggal Lulus : 23 Maret 2004



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia, dan kasih sayang-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Mempelajari Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Antarasa (*Litsea cubeba*) dan Aplikasinya sebagai Pengawet Alami pada Bahan Pangan".

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah banyak membantu sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

1. Dr. Ir. Hj. Sedarnawati Yasni, M.Agr. sebagai dosen pembimbing atas bimbingan, saran dan bantuan baik moril maupun materil kepada penulis selama studi dan pelaksanaan penelitian maupun penulisan skripsi.
2. Dr. Ir. Feri Kusnandar, MSc. dan Ir. Dede Robiatul Adawiyah, MSi. atas kesediaannya menjadi dosen penguji serta arahan dan masukannya.
3. Bapak dan Umi atas segala perjuangan, kerja keras, pengorbanan, kasih sayang dan doanya untuk penulis, serta Kakak dan Adik-adikku tercinta yang selalu memberi dukungan dan semangatnya selama ini.
4. Staf pengajar Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi-IPB yang telah banyak memberikan ilmunya selama penulis menempuh studi.
5. Sahabat-sahabatku (Yuni, Yuli, Tyas, Ima, Irma, Emma, Kiki, Ida, Asih, Didie, dan Dety), untuk indahnya persahabatan yang kalian berikan.
6. Temanku seperjuangan dan seperguruan Evita dan Dian "DW", serta teman-teman TPG'36 untuk kebersamaan selama menempuh studi.
8. Para teknisi/laboran TPG dan PAU (Pak Sobirin, Pak Wachid, Pak Rojak, Pak Sidik, Pak Koko, Pak Moel, Pak Yahya, Pak Gatot, Bu Rub, Mbak Ida, Mbak Yane, Mbak Resti, Mbak Ari, dan Mas Taufik) atas semua bantuannya.
9. Kakak-kakakku TPG'35 (Agus, Jubel, Pungky), terima kasih untuk semua bantuan dan semangat yang diberikan kepada penulis.
10. Admin Lab-Kom TPG, terimakasih untuk bantuan dan kesabarannya, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang selalu memberikan bantuan, semangat, dan perhatian kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, karena itu kritik dan saran yang berguna untuk perbaikan skripsi ini sangat diharapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Bogor, April 2004

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
I. PENDAHULUAN .....	1
A. LATAR BELAKANG .....	1
B. TUJUAN PENELITIAN .....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
A. ANTARASA ( <i>Litsea cubeba</i> ) .....	3
B. IKAN KAKAP MERAH ( <i>Lutjanus erythropterus</i> ) .....	4
C. AKTIVITAS ANTIMIKROBA .....	5
D. ANTIOKSIDAN DAN METODE PENGUKURANNYA .....	7
E. MIKROBA PATOGEN DAN PERUSAK BAHAN PANGAN .....	11
F. PROSES PENURUNAN MUTU IKAN .....	15
III. METODOLOGI PENELITIAN .....	17
A. BAHAN DAN ALAT .....	17
B. METODE PENELITIAN .....	18
1. Persiapan Bahan Baku dan Ekstrak Antarasa .....	18
2. Pengujian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba .....	20
3. Penentuan MIC ( <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ) Ekstrak Antarasa .....	22
4. Aplikasi Ekstrak Antarasa pada Bahan Pangan .....	22
a. Pengukuran derajat keasaman (pH) .....	24
b. Uji Total Volatile Base Nitrogen/TVN dan Tri Methyl Amine/TMA .....	24
c. Uji total mikroba/ <i>Total Plate Count</i> .....	25
d. Uji organoleptik .....	26
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	27
A. PERSIAPAN BAHAN BAKU DAN EKSTRAK ANTARASA .....	27
B. AKTIVITAS ANTIOKSIDAN.....	29



C. AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN NILAI MIC.....	34
D. APLIKASI EKSTRAK ANTARASA PADA BAHAN PANGAN ....	41
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	47
A. KESIMPULAN .....	47
B. SARAN .....	48
DAFTAR PUSTAKA .....	49
LAMPIRAN .....	52

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komposisi kimia ikan kakap merah ( <i>Lutjanus erythropterus</i> ) .....	5
Tabel 2. Data rendemen dan karakteristik ekstrak antarasa .....	29
Tabel 3. Nilai IC <sub>50</sub> dari masing-masing sampel antioksidan.....	33

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Buah antarasa ( <i>Litsea cubeba</i> ) .....	3
Gambar 2. Mekanisme kerja antioksidan fenolik .....	8
Gambar 3. Tahapan proses penelitian .....	18
Gambar 4. Diagram alir proses ekstraksi dengan cara maserasi .....	19
Gambar 5. Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH .....	21
Gambar 6. Diagram alir aplikasi ekstrak antarasa pada bahan pangan .....	24
Gambar 7. Kurva kenaikan bilangan peroksida masing-masing sampel pada konsentrasi 200 ppm selama waktu penyimpanan .....	30
Gambar 8. Histogram periode induksi masing-masing sampel .....	31
Gambar 9. Aktivitas antimikroba ekstrak antarasa .....	36
Gambar 10. Areal penghambatan minyak atsiri antarasa pada bakteri uji .....	36
Gambar 11. Areal penghambatan ekstrak heksan antarasa pada bakteri uji ...	37
Gambar 12. Areal penghambatan ekstrak etanol antarasa pada bakteri uji ....	38
Gambar 13. Areal penghambatan ekstrak antarasa pada <i>Bacillus cereus</i> .....	40
Gambar 14. Perubahan pH fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	42
Gambar 15. Perubahan kadar TVN fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	43
Gambar 16. Perubahan kadar TMA fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	44
Gambar 17. Perubahan kandungan total mikroba fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	45

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data pengukuran absorbansi dan nilai regresi linier masing-masing sampel dengan metode tiosianat .....	53
Lampiran 2. Nilai periode induksi masing-masing sampel .....	53
Lampiran 3. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-0 .....	54
Lampiran 4. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-1 .....	55
Lampiran 5. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-2 .....	56
Lampiran 6. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-3 .....	57
Lampiran 7. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-4 .....	58
Lampiran 8. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-5 .....	59
Lampiran 9. Aktivitas antimikroba ekstrak antarasa terhadap bakteri uji ....	60
Lampiran 10. Nilai <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) ekstrak antarasa terhadap bakteri uji .....	61
Lampiran 11. Perubahan pH fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan.....	61
Lampiran 12. Perubahan kadar TVN fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	61
Lampiran 13. Perubahan kadar TMA fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	61
Lampiran 14. Perubahan kandungan total mikroba fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	62
Lampiran 15. Perubahan organoleptik fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan .....	62

## I. PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Rempah-rempah merupakan salah satu kekayaan alam Indonesia yang sering digunakan sebagai bumbu masakan terutama pada masakan tradisional untuk memberikan citarasa, membangkitkan selera makan, serta dapat mengawetkan produk pangan. Antarasa (*Litsea cubeba*) merupakan jenis rempah yang sering digunakan pada masakan khas Sumatera Utara. Menurut Hasairin (1994) di beberapa kecamatan di provinsi Sumatra Utara yang didiami oleh masyarakat Batak Angkola dan Mandailing terdapat 29 jenis rempah-rempah yang terdiri dari 15 suku tumbuhan yang sudah dimanfaatkan pada 11 macam masakan adatnya. Dari 29 jenis rempah tersebut 12 jenis diantaranya belum termasuk dalam daftar rempah yang dimanfaatkan di Asia Tenggara.

Pada umumnya masyarakat Batak Toba menyukai buah antarasa karena rasa dan aromanya yang khas. Menurut informasi yang didapat dari masyarakat, buah antarasa bermanfaat sebagai senyawa yang dapat menambah nafsu makan. Selain itu, daun antarasa juga dapat digunakan sebagai obat-obatan misalnya rematik, pegal-pegal, demam dan lain-lain. Namun tanaman antarasa ini belum banyak dikenal oleh masyarakat sehingga belum dibudidayakan.

Masakan-masakan khas Sumatera Utara yang menggunakan antarasa sebagai campuran bumbunya seperti gule arsik (gulai ikan) dan naniura pada umumnya memiliki daya simpan yang cukup lama. Hal tersebut diduga karena adanya daya antimikroba yang terkandung di dalam rempah antarasa. Penelitian yang dilakukan oleh Mulia (2000) dan Ardiansyah (2001) menunjukkan bahwa rempah antarasa (*Litsea cubeba*) mempunyai aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan perusak makanan.

Banyak penelitian yang menyebutkan bahwa selain memiliki aktivitas antimikroba, rempah-rempah juga mempunyai aktivitas antioksidan. Penggunaan rempah-rempah sebagai antioksidan secara langsung dapat dilakukan dengan mengekstraksi minyak atsirinya. Minyak atsiri antarasa

mengandung komponen volatil seperti  $\beta$ -mirsen, 1-limonen, 1,8-sineol,  $\alpha$ -terpinolen, trans-karyopilen dan  $\beta$ -farnesen (Yasni, 2001). Senyawa-senyawa tersebut yang diduga mempunyai aktivitas antimikroba dan antioksidan. Namun sejauh ini belum ada hasil penelitian mengenai kandungan antioksidan dari rempah antarasa, karena itu penelitian ini merupakan kajian awal untuk mengetahui potensi antarasa sebagai sumber antioksidan alami.

Ikan merupakan jenis bahan pangan yang mudah sekali rusak. Ikan kakap merah misalnya, yang mempunyai nilai ekonomis tinggi membutuhkan penanganan yang baik untuk pengolahan lebih lanjut. Ikan kakap mempunyai kandungan air cukup tinggi dan nutrisi lengkap yang memungkinkan mikroba untuk tumbuh. Baik buruknya penanganan akan menentukan mutu ikan sebagai bahan makanan atau bahan mentah sehingga ikan tersebut tetap layak untuk dikonsumsi. Berbagai cara telah dilakukan untuk memperpanjang masa simpan ikan kakap, baik perlakuan fisik (dengan menyimpan dalam lemari pendingin) maupun perlakuan kimiawi (penambahan bahan pengawet).

Di bidang pangan antioksidan digunakan untuk melindungi lemak atau minyak terhadap kerusakan oksidatif. Adanya kekhawatiran masyarakat terhadap efek samping antioksidan dan antimikroba atau bahan pengawet sintetik yang dapat membahayakan kesehatan, mendorong banyak peneliti untuk menggali sumber-sumber antioksidan dan antimikroba alami yang aman digunakan pada produk pangan. Salah satu sumbernya adalah rempah-rempah seperti halnya antarasa yang dikhawatirkan berkurang penggunaannya dan terancam punah. Mulyono (2003) menyatakan bahwa rempah antarasa efektif mempertahankan kesegaran fillet (daging) ikan kakap merah selama penyimpanan pada suhu rendah.

## **B. TUJUAN PENELITIAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan antimikroba dari ekstrak antarasa (*Litsea cubeba*) dan aplikasinya pada bahan pangan (ikan kakap merah). Diharapkan antarasa dapat dijadikan salah satu alternatif sumber antioksidan dan antimikroba alami sebagai pengawet pada bahan pangan yang mudah rusak seperti ikan kakap merah.

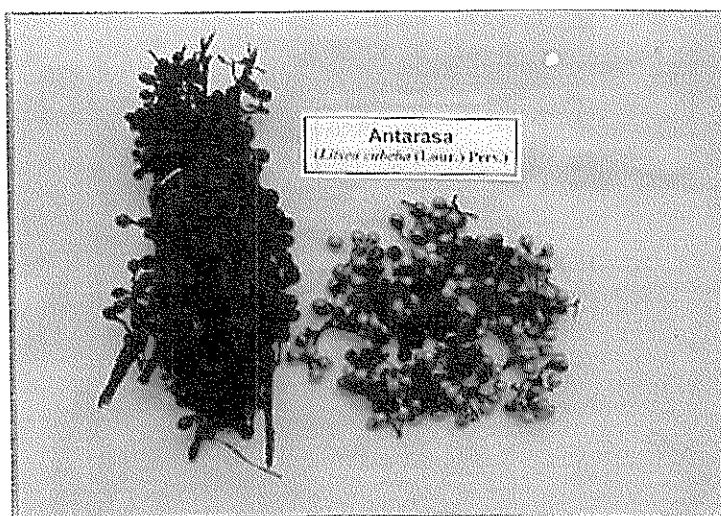
## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. ANTARASA (*Litsea cubeba*)

Antarasa adalah jenis rempah-rempah khas Sumatera Utara. Tanaman antarasa belum dikenal oleh masyarakat secara luas karena itu belum banyak pustaka yang memuat hal-hal mengenai rempah ini, sehingga sampai sekarang belum mempunyai nilai ekonomis.

Menurut Depkes (1986), taksonomi tanaman antarasa adalah sebagai berikut :

- Divisio : Spermatophyta
- Kelas : Dicotyledoneae
- Ordo : Ebenales
- Famili : Sapotaceae
- Genus : *Litsea*
- Spesies : *Litsea cubeba*



Gambar 1. Buah antarasa (*Litsea cubeba*)

Pada umumnya, masyarakat Batak Toba menyukai rempah antarasa karena rasa dan aromanya yang khas. Antarasa sering diperjualbelikan di pasar-pasar sekitar Danau Toba. Buah antarasa tidak dapat disimpan lama, hal ini menjadi salah satu kendala dalam pemasaran. Buah yang matang segar

warnanya coklat kehitaman, dan cepat menghitam pertanda buah sudah busuk. Bentuk buah antarasa dapat dilihat pada Gambar 1.

Tanaman antarasa tergolong memiliki daun tidak lengkap atau *folium incopletum* karena daunnya terdiri atas tangkai daun (petiolis) dan helaian daun (lamina). Bentuk daun tanaman antarasa adalah memanjang (oblongis) dengan panjang helaian daun kira-kira tiga kali lebarnya.

Menurut masyarakat setempat antarasa sudah mulai berbuah pada umur sekitar dua tahun. Buahnya enak dengan aroma yang khas, tetapi mempunyai kelemahan sebab buah tersebut mengandung getah yang banyak. Tanaman antarasa merupakan tanaman tahunan dengan satu kali musim berbuah, yaitu pada bulan Januari sampai Mei. Tinggi pohon tanaman ini dapat mencapai 20 meter pada umur lebih kurang 35 tahun. Pada umur di atas 35 tahun secara alamiah tanaman ini sudah menurun produksinya.

Menurut Heyne (1987) buah muda yang berbau harum adalah jenis buah yang paling banyak digunakan sebagai sambal dan bumbu bandrek. Minyak atsiri buah antarasa mengandung 85% aldehida, di antaranya 64% *citral* yang dapat menyebabkan bersin. Di samping itu buah antarasa ini juga mengandung 0.1% *laurotetanine*.

## **B. IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus erythropterus*)**

Ikan kakap merah merupakan salah satu jenis ikan demersal (dasar) bernilai ekonomis tinggi yang banyak dihasilkan dari perairan laut Indonesia. Deskripsi ikan kakap merah secara lengkap adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Sub phylum : Vertebrata  
Kelas : Pisces  
Sub kelas : Teleostei  
Ordo : Percomorphi  
Sub Ordo : Percoidae  
Famili : Lutjanidae



Genus : Lutjanus  
Spesies : *Lutjanus erythropterus*

Ikan kakap mempunyai bentuk badan memanjang, dapat mencapai panjang 200 cm, umumnya 25-100 cm, gepeng, batang sirip ekor lebar. Mulutnya lebar, sedikit serong dan gigi-giginya halus. Bagian bawah pra-penutup insang ikan ini berduri kuat, bagian atas penutup insang terdapat cuping bergerigi. Bagian punggung warnanya mendekati keabuan, putih perak bagian bawah, sirip-siripnya abu gelap. Ikan kakap termasuk ikan buas, makanannya adalah ikan-ikan kecil dan *crustacea*. Hidupnya di perairan pantai, muara-muara sungai, teluk-teluk, dan air payau (Ditjen Perikanan, 1990). Komposisi kimia ikan kakap merah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia ikan kakap merah (*Lutjanus erythropterus*)

Komposisi kimia	Berat (%)
Air	80.3
Protein	18.2
Lemak	0.4
Karbohidrat	0
Abu	1.1

Sumber : FAO dalam Marumata (2001)

### C. AKTIVITAS ANTIMIKROBA

Zat antimikroba adalah senyawa biologis atau kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Menurut Fardiaz (1987), zat antimikroba dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal, fungistatik atau menghambat germinasi spora bakteri. Kemampuan suatu zat antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya : (1) konsentrasi zat antimikroba; (2) suhu lingkungan; (3) waktu penyimpanan; (4) sifat-sifat mikroba, meliputi jenis, jumlah, umur, dan keadaan mikroba; dan (5) sifat-sifat fisik dan kimia makanan, termasuk kadar air, pH, jenis, dan jumlah senyawa di dalamnya.

Zat-zat yang digunakan sebagai antimikroba harus mempunyai beberapa kriteria ideal antara lain aman, ekonomis, tidak menyebabkan perubahan flavor, citarasa dan aroma makanan, tidak mengalami penurunan aktivitas

karena adanya komponen makanan, tidak menyebabkan timbulnya galur resisten, dan sebaiknya bersifat membunuh daripada hanya menghambat pertumbuhan mikroba.

Mekanisme kerja senyawa yang bersifat antimikroba ada beberapa cara, yaitu: (1) merusak dinding sel mikroorganisme sehingga menyebabkan terjadinya lisis; (2) mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel; (3) menyebabkan terjadinya denaturasi protein sel; dan (4) menghambat kerja enzim di dalam sel.

Menurut Pelczar *et al.* (1993) senyawa kimia yang memiliki sifat sebagai antimikroba adalah fenol dan senyawa fenolik, alkohol, halogen, logam berat, detergen, dan senyawa amonium kuartener. Mekanisme senyawa fenol sebagai zat antimikroba adalah dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel, serta mengendapkan protein sel mikroba. Komponen fenol juga dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap germinasi spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam proses germinasi. Senyawa fenolik bermolekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah.

Salah satu jenis bahan pangan yang banyak mengandung senyawa antimikroba adalah rempah-rempah. Aktivitas antimikroba rempah-rempah tergantung pada satu atau beberapa komponen minyak atsiri dan komponen non volatilnya. Senyawa tersebut mungkin terdapat pada berbagai jenis rempah atau hanya khas pada rempah-rempah tertentu. Adakalanya minyak atsiri dapat menambah aktivitas zat lain yang bersifat antimikroba, atau dalam keadaan tertentu minyak atsiri berfungsi sebagai pengawet utama.

Penelitian tentang adanya kandungan antimikroba dari rempah-rempah telah banyak dilakukan, antara lain pada cengkeh, kayu manis, *mustard*, kasia, *allspice*, kunyit, bawang putih, kapulaga, kayu manis, dan masih banyak yang lainnya. Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Mulia (2000) dan Ardiansyah (2001) dapat diketahui bahwa rempah antarasa mempunyai aktivitas antimikroba. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mulia (2000), ekstrak antarasa mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*,

*Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhosa*, dan *Staphylococcus aureus*. Selain itu, serbuk antarasa mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Salmonella Typhimurium*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Fusarium* (Ardiansyah, 2001). Daya hambat rempah tersebut besarnya berbeda-beda terhadap jenis bakteri atau kapang yang diujikan.

#### D. ANTIOKSIDAN DAN METODE PENGUKURANNYA

Menurut Cuppett *et al.* (1997), antioksidan dinyatakan sebagai suatu senyawa yang ketika berada pada konsentrasi rendah dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi, secara nyata dapat memperlambat oksidasi substrat tersebut. Antioksidan terdapat secara alami dalam hampir semua bahan pangan. Antioksidan bereaksi dengan oksidan sehingga mengurangi kapasitas oksidan untuk menimbulkan kerusakan. Sistem antioksidan tubuh mampu melindungi jaringan tubuh itu sendiri dari efek negatif radikal bebas.

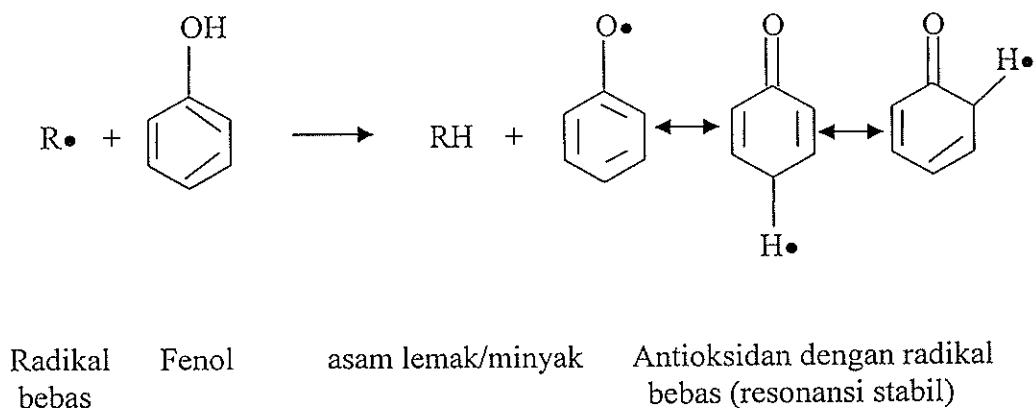
Jenis antioksidan sangat beragam. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer atau antioksidan pemecah rantai (*Chain-breaking antioxidant*) dapat bereaksi dengan radikal lemak dan mengubahnya menjadi produk yang stabil, contohnya seperti tokoferol, lesitin, asam askorbat. Antioksidan sekunder dikenal juga sebagai antioksidan preventif. Sifatnya menurunkan inisiasi melalui berbagai mekanisme, seperti melalui pengikatan ion-ion logam, penangkapan oksigen, penguraian hidroperoksida menjadi produk-produk non radikal. Menurut Winarno (1995), antioksidan sekunder adalah suatu zat yang dapat mencegah kerja prooksidan sehingga dapat digolongkan sebagai sinergik. Contoh antioksidan sekunder antara lain asam sitrat dan EDTA (*Etylene-diaminetetra-acetic acid*).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Antioksidan sintetik yang umumnya digunakan dalam produk pangan antara lain BHA (butylated hidroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), PG

(propil galat), dan TBHQ (tert-butylhydroxyquinone). BHA dan BHT sangat efektif untuk lemak hewan, sedangkan PG selain untuk lemak hewan juga baik untuk minyak nabati walaupun senyawa ini menimbulkan perubahan warna jika terdapat besi dan air. Kecenderungan perubahan warna dalam penggunaan PG tidak terjadi pada TBHQ (Karyadi, 1997).

Antioksidan alami banyak terdapat dalam tanaman pada seluruh bagian dari tanaman seperti akar, daun, bunga, biji, batang dan sebagainya. Menurut Pratt dan Hudson (1990) senyawa-senyawa yang umumnya terkandung dalam antioksidan alami adalah fenol, polifenol, dan yang paling umum adalah flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin, flavonon), turunan asam sinamat, tokoferol, dan asam organik polifungsi. Saat ini tokoferol sudah diproduksi secara sintetik untuk tujuan komersial.

Antioksidan yang digunakan pada pangan merupakan senyawa atau substansi yang dapat menghambat atau bergabung dengan radikal bebas hasil reaksi autoksidasi pada oksidasi gliserida. Kemampuan ini disebabkan karena struktur atau konfigurasi fenolik dalam struktur molekul. Aksi dari senyawa fenolik dalam menghambat autoksidasi adalah karena senyawa fenolik berfungsi sebagai donor hidrogen pada radikal yang terbentuk ( $R\bullet$ ) sehingga dihasilkan RH dan senyawa fenolik yang memiliki radikal bebas (Gambar 2). Antioksidan yang memiliki radikal bebas ini tidak mempunyai kemampuan untuk menginisiasi atau mempropagasi oksidasi lemak atau minyak.



Gambar 2. Mekanisme kerja antioksidan fenolik

Reaksi autoksidasi tidak dapat dicegah tetapi hanya diperlambat dan lamanya diperlambat tergantung pada aktivitas antioksidan yang bersangkutan dan konsentrasinya serta faktor lain seperti panas, cahaya, logam, dan pro-oksidan lain yang berada dalam sistem. Fenolik antioksidan tidak berfungsi sebagai penyerap oksigen, tetapi hanya mencegah pembentukan radikal bebas pada lemak yang bereaksi dengan menyerap oksigen pada proses autoksidasi (Sherwin, 1990).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa yang diekstrak dari sumber alami menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan dan kadang-kadang justru lebih efektif daripada antioksidan sintetik yang telah digunakan secara luas. Berbagai rempah dan herba telah diidentifikasi memiliki senyawa yang sangat efektif sebagai antioksidan. Ekstrak etanol daun *rosemary* adalah salah satu antioksidan dari rempah-rempah yang telah digunakan pada industri makanan. Rosmariquinone dan rosmaridifenol yang diekstrak dari tanaman herba *rosemary* diidentifikasi memiliki potensi yang sama atau lebih tinggi dari BHA dan BHT (Sherwin, 1990). Hasil penelitian Widiastuti (2000) tentang aktivitas antioksidan dari rempah andaliman yang diekstrak dengan campuran pelarut etil asetat dan etanol 10 : 1 secara soxhlet menunjukkan aktivitasnya lebih tinggi dari  $\alpha$ -tokoferol, meskipun masih lebih rendah dari BHT.

Antioksidan dapat diketahui aktivitasnya dengan cara menentukan kemampuan proteksi antioksidan terhadap oksidasi lipid atau daya tahan lipid tersebut terhadap proses oksidasi. Oksidasi lipid dipengaruhi oleh suhu, cahaya, oksigen, dan adanya ion logam. Pada penelitian di bidang pangan, kondisi pengujian biasanya dilakukan pada suhu kamar namun membutuhkan waktu uji yang lama. Oleh sebab itu pengujian sering dipercepat dengan cara meningkatkan suhu penyimpanan, hembusan oksigen pada substrat, penambahan ion logam sebagai katalis, dan atau mengekspos sampel pada cahaya.

Beberapa metode pengukuran aktivitas antioksidan yang dapat digunakan antara lain metode  $\beta$ -karoten/linoleat, metode diene terkonyugasi, metode Rancimat, metode DPPH dan metode tiosianat. Metode  $\beta$ -karoten/linoleat

merupakan suatu metode yang cepat dan rutin untuk menentukan tingkat aktivitas antioksidan. Prosedur ini berdasarkan pada minimisasi kehilangan warna  $\beta$ -karoten pada oksidasi ganda asam linoleat dan  $\beta$ -karoten dalam sistem *aqueous*. Kerusakan oksidatif dari  $\beta$ -karoten dalam sistem, diukur secara kolorimetri pada panjang gelombang 470 nm. BHA, BHT dan PG telah dievaluasi aktivitas antioksidannya dengan metode ini (Kochhar dan Rossel, 1990).

Metode diene terkonyugasi digunakan untuk mengukur absorbansi yang disebabkan oleh struktur diene terkonyugasi yang terdapat di dalam sampel lemak dan minyak. Pembentukan diene terkonyugasi proporsional dengan konsumsi oksigen dan pembentukan peroksida selama tahap awal oksidasi. Asam lemak yang mengandung dua ikatan rangkap terkonyugasi menunjukkan penyerapan pada panjang gelombang 230-234 nm (White, 1995). Metode diene terkonyugasi dapat digunakan sebagai indeks kestabilan lipid menggantikan bilangan peroksida karena lebih cepat daripada penentuan bilangan peroksida, jauh lebih sederhana, tidak tergantung dari reaksi kimia atau perubahan warna dan membutuhkan sampel dalam ukuran yang lebih kecil.

Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode Rancimat adalah proses oksidasi dipercepat dengan cara induksi aliran udara melewati minyak yang dipanaskan, misalnya pada suhu  $\pm 100^{\circ}\text{C}$ . Reaksi autoksidasi dapat menghasilkan hidroperoksida dan juga asam format atau lebih umum lagi adalah pembentukan senyawa ionik yang dapat mengubah konduktivitas air bebas ion pada alat Rancimat. Pada awal reaksi oksidasi tidak ada peningkatan konduktivitas yang dapat diamati dan hanya pada tahap selanjutnya terjadi peningkatan konduktivitas secara cepat (periode induksi). Pada metode Rancimat ini, biasanya uji dilakukan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  atau sampai  $140^{\circ}\text{C}$  untuk minyak atau lemak yang sangat stabil (Loliger, 1983).

Pada metode DPPH *free radical scavenging activity*, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) digunakan sebagai model radikal bebas. Jika senyawa ini masuk dalam tubuh manusia dan tidak terkendalikan dapat menyebabkan kerusakan fungsi sel. Dalam uji ini metanol digunakan sebagai

pelarut, sedangkan inkubasi pada suhu 37°C dimaksudkan untuk mengoptimalkan aktifitas DPPH. Antioksidan dalam rempah-rempah akan bereaksi dengan DPPH dan mengubahnya menjadi 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine. Perubahan serapan yang dihasilkan oleh reaksi ini menjadi ukuran kemampuan antioksidasi dari bahan tersebut (Hatano *et al.*, 1988).

Aktivitas antioksidan pada metode DPPH dinyatakan dengan IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration*). IC<sub>50</sub> adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 50, kuat untuk IC<sub>50</sub> antara 50-100, sedang jika IC<sub>50</sub> bernilai 101-150, dan lemah jika IC<sub>50</sub> bernilai 151-200.

Uji tiosianat (Chen *et al.*, 1995) merupakan uji yang mengukur aktivitas antioksidan dalam menghambat terjadinya senyawa radikal yang reaktif (peroksida) secara kualitatif. Asam linoleat dalam kondisi buffer pada suhu 37°C selama penyimpanan akan teroksidasi dan menghasilkan peroksida. Peroksida ini akan mengoksidasi ion fero dari FeCl<sub>2</sub> menjadi ion feri (FeCl<sub>3</sub>) yang akan membentuk warna merah jika direaksikan dengan amonium tiosianat. Semakin banyak peroksida yang terbentuk maka semakin merah intensitas warna yang dihasilkan. Bilangan peroksida dihitung berdasarkan nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 500 nm.

Dalam metode tiosianat, aktivitas antioksidan dinyatakan dengan periode induksi yang dapat dihitung dari nilai absorbansi dan lama penyimpanan. Periode induksi merupakan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai absorbansi 0.3. Menurut Chen *et al.* (1995) nilai absorbansi 0.3 menunjukkan batas jumlah peroksida dari ekstrak antioksidan yang tidak mampu lagi menghambat reaksi oksidasi asam linoleat, sehingga asam linoleat dianggap sudah rusak.

## **E. MIKROBA PATOGEN DAN PERUSAK BAHAN PANGAN**

Keberadaan mikroba di alam tersebar luas sehingga produk pangan jarang sekali yang steril dan umumnya tercemar oleh berbagai jenis mikroba.

Mikroba pada bahan pangan dapat menyebabkan kerusakan, yang dapat berupa kebusukan dan keracunan. Kebusukan disebabkan oleh aktivitas mikroba pembusuk, sedangkan keracunan disebabkan oleh adanya mikroba patogen atau racun yang dihasilkan oleh mikroba patogen. Contoh mikroba penyebab kerusakan pangan adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Mikroba patogen dibedakan menjadi patogenik penyebab penyakit (infeksi) dan patogenik penyebab penyakit karena keracunan (intoksikasi). Mikroba penyebab infeksi misalnya *Salmonella Typhimurium*, sedangkan penyebab intoksikasi misalnya *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*.

#### 1. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri ini termasuk ke dalam famili *Pseudomonadaceae*, bersifat gram negatif, berbentuk batang, tidak membentuk spora, dapat bergerak, umumnya mempunyai flagella polar tunggal dan tipe metabolismenya bersifat oksidatif. Umumnya *Pseudomonas* berukuran kecil dengan lebar 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  dan panjang 1.5-4.0  $\mu\text{m}$ . Tumbuh baik pada suhu rendah, bersifat psikrofilik atau mesofilik dengan suhu optimum relatif rendah, kecuali *P. aeruginosa* dan *P. fluorescens* yang dapat tumbuh pada suhu 37°C. Bakteri ini dapat memproduksi pigmen piosianin yang berwarna biru dan merupakan salah satu jenis bakteri yang sering menimbulkan kerusakan pada berbagai jenis makanan (Fardiaz, 1992).

Kerusakan makanan yang ditimbulkan oleh bakteri ini sebagian besar berhubungan dengan kemampuannya dalam memproduksi enzim yang dapat memecahkan komponen lemak dan protein dalam makanan. *Pseudomonas* dapat berkembang dengan cepat pada suhu rendah dan sering mengakibatkan terbentuknya lendir dan pigmen pada permukaan daging yang didinginkan.

*Pseudomonas* banyak ditemukan dalam air, tanah, tumbuhan, saluran usus manusia dan hewan. Bakteri ini sering menimbulkan kerusakan pada bahan pangan seperti daging, unggas, telur, dan hasil perikanan (Jay, 1996). *P. aeruginosa* tidak tahan terhadap panas dan keadaan kering, oleh karena



itu dengan perlakuan pemanasan dan pengeringan bakteri jenis ini mudah untuk dicegah pertumbuhannya.

## 2. *Salmonella Typhimurium*

*Salmonella Typhimurium* merupakan bakteri gram negatif dan termasuk famili *Enterobacteriaceae*, dengan sel berbentuk batang dan tidak berspora. *S. Typhimurium* tumbuh optimum pada suhu 37°C, suhu terendah 6-20°C dan pada suhu tertinggi (45°C) bakteri ini masih dapat hidup. Bakteri ini tumbuh pada kisaran pH antara 4.0-9.0 dengan nilai pH optimum 6.5-7.5. Pada pH di bawah 4.0 dan di atas 9.0 bakteri ini akan mati secara perlahan-lahan. Viabilitas *Salmonella* menurun selama penyimpanan beku (Portillo, 2000).

*Salmonella* merupakan golongan bakteri penyebab infeksi yang jika tertelan dan masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan gejala yang disebut *Salmonellosis*. Gejala *Salmonellosis* yang sering terjadi adalah gastroenteritis dan sering disebabkan oleh *S. Typhimurium*. Pencegahan *Salmonella* dapat dilakukan dengan sanitasi yang baik terhadap alat-alat pengolahan, ruang pengolahan, lingkungan, dan para pekerja. Makanan tidak boleh terlalu lama pada suhu kamar, dan penyimpanan harus dilakukan pada suhu rendah.

## 3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk kokus dengan diameter 0.5-1.5 µm dan termasuk famili *Micrococcaceae*. *S. aureus* hidup secara aerobik ataupun anaerobik fakultatif. Sifat lainnya adalah non motil dan tidak membentuk spora. *S. aureus* tahan garam dan tumbuh baik pada medium yang mengandung 7.5% NaCl, serta dapat memfermentasi manitol.

Pada umumnya *S. aureus* mampu memproduksi pigmen kuning keemasan dan koagulase, sehingga dapat dibedakan atas beberapa grup berdasarkan sifat imunitas koagulasenya, yaitu koagulase tipe I sampai VIII. Suhu optimum pertumbuhan *S. aureus* adalah 35-37°C, dengan suhu

minimum 6.7°C dan suhu maksimum 45.5°C. *S.aureus* dapat tumbuh pada pH 4.0-9.8 dengan pH optimum sekitar 7.0-7.5. Pertumbuhan pada pH mendekati 9.8 hanya mungkin bila substratnya mempunyai komponen yang baik untuk pertumbuhannya (Supardi dan Sukanto, 1999).

Keracunan oleh *S.aureus* disebabkan oleh *S.aureus* tumbuh di dalam bahan pangan dan membentuk enterotoksin sebagai produk metabolitnya. Keberadaan *S.aureus* tidak wajar dalam makanan. Makanan yang terkontaminasi *S.aureus* biasanya berasal dari kulit manusia yang kontak dengan makanan (Adam dan Moss, 1995). Secara umum bakteri ini tidak kuat bersaing dengan bakteri lainnya sehingga tidak mempunyai peran yang berarti pada bahan pangan yang tidak dimasak. Pada bahan pangan yang telah dimasak, *S.aureus* dapat terus berkembang mencapai tingkat yang membahayakan padahal bakteri lain akan terhambat.

#### 4. *Bacillus cereus*

Species *Bacillus* ada yang mempunyai sifat proteolitik kuat, sedang, atau tidak bersifat proteolitik. Salah satu species yang bersifat proteolitik yaitu *B.cereus*, dapat memproduksi enzim proteolitik yang sifatnya menyerupai *rennin* sehingga dapat menggumpalkan susu (Fardiaz, 1992).

*B.cereus* merupakan bakteri gram positif yang mempunyai ukuran sel yang besar, yaitu sekitar 1.0-1.2 µm dengan panjang 3.0-5.0 µm, bersifat anaerobik fakultatif dan dapat membentuk spora. Sporangia tidak membengkak, berbentuk elips dan terletak di tengah atau agak di tengah sel (Fardiaz, 1989).

*B.cereus* pada umumnya terdapat di dalam tanah dan pada tanaman, juga telah diisolasi dari berbagai makanan. Bakteri ini dapat menyebabkan kebusukan makanan, tumbuh pada suhu 10-40°C dan pH 4.9-9.3. Suhu optimum untuk pertumbuhan adalah 28-35°C dengan pH optimum 7.0-7.5 (Fardiaz, 1989).

*B.cereus* dapat menyebabkan intoksikasi. Jenis toksin yang dihasilkan dapat digolongkan menjadi toksin emetik dan toksin diaregenik. Makanan yang berhubungan dengan gejala emetik adalah produk pangan

berkarbohidrat seperti nasi dan pasta, sedangkan makanan yang berhubungan dengan gejala diaregenik adalah produk daging, sup, sayuran, puding dan saus (Adam dan Moss, 1995).

## F. PROSES PENURUNAN MUTU IKAN

Ikan merupakan produk yang mudah busuk. Setelah ikan ditangkap dan mati akan terjadi proses kemunduran mutu (deteriorasi) yang disebabkan oleh faktor internal maupun faktor eksternal yang mengarah pada proses pembusukan sampai akhirnya ikan menjadi busuk. Faktor internal penyebab penurunan mutu adalah akibat aktivitas enzim dan bakteri dalam ikan yang tidak terkendali segera setelah ikan mati. Faktor eksternal yang mendorong penurunan mutu ikan adalah suhu lingkungan yang tinggi, penanganan ikan yang kasar, dan terjadinya luka pada ikan ketika ditangkap (Gill, 1992).

Tahap-tahap kemunduran kesegaran ikan adalah pre-rigor, rigor mortis, dan post rigor (autolisis dan penyerangan bakteri). Tahap pre-rigor yaitu saat terjadinya peristiwa pelepasan lendir dan kelenjar di bawah kulit ikan yang akan membentuk lapisan bening tebal di sekeliling tubuh ikan. Keadaan pre-rigor terjadi saat jaringan otot masih lembut dan lentur serta secara biokimia ditandai dengan menurunnya kadar adenosin trifosfat (ATP) dan kreatin fosfat (Eskin, 1990).

Tahap rigor mortis ditandai dengan keadaan otot yang kaku dan keras. Hilangnya kelenturan ikan berhubungan dengan terbentuknya aktomiosin, yang berlangsung lambat pada tahap awal dan kemudian menjadi cepat pada tahap selanjutnya. Rigor mortis dianggap penting dalam industri perikanan, selain dapat memperlambat pembusukan oleh mikroba juga sebagai petunjuk bahwa ikan masih dalam keadaan sangat segar (Eskin, 1990).

Setelah tingkat rigor berakhir, maka terjadi tingkat post rigor yaitu kembali melunaknya tekstur daging ikan (Eskin, 1990). Tingkat post rigor merupakan permulaan dari proses pembusukan yang meliputi autolisis serta pembusukan oleh bakteri. Proses autolisis adalah terjadinya penguraian daging ikan sebagai akibat dari getah-getah pencernaan ikan. Ciri terjadinya autolisis adalah adanya amoniak, karena amoniak tidak ada sebelum tingkat post rigor.

Proses autolisis akan menyebabkan penguraian protein menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu menjadi peptida, asam amino, dan amoniak yang dapat meningkatkan pH jaringan ikan. Pembusukan yang disebabkan oleh aktivitas bakteri tidak akan terjadi sebelum masa rigor mortis berakhir. Senyawa-senyawa yang dihasilkan dalam dekomposisi bakteri dapat digunakan sebagai indikator tingkat kesegaran ikan atau kebusukan ikan.

Untuk mengetahui tingkat kesegaran ikan secara kimiawi, salah satu parameter yang dapat digunakan adalah mengukur kandungan senyawa volatil total di dalamnya. Senyawa volatil yang terdapat pada hasil laut, seperti ikan dan kerang-kerangan meliputi *Total Volatil Bases* (TVB), *Total Volatile Substances* (TVS) dan *Total Volatile Nitrogen* (TVN). TVN meliputi TVB dan senyawa nitrogen lainnya yang didapat dari hasil destilasi uap sampel. Sedangkan TVB meliputi amonia, dimetilamin, dan trimetilamin (TMA).

Trimetilamin (TMA) merupakan hasil reduksi dari trimetilaminoksida (TMAO) oleh bakteri fakultatif seperti *Pseudomonas putrefaciens* yang akan memberikan bau khas ikan busuk. Pada ikan air tawar kandungan TMAO sedikit sekali atau bahkan tidak ada, sedangkan pada ikan air laut TMAO yang terdapat pada ikan berfungsi sebagai bagian dari sistem buffer. Adanya bahan pengawet seperti EDTA menjaga produksi TMA tetap rendah dengan menghambat pertumbuhan *Pseudomonas putrefaciens* selama proses pembusukan terjadi. Connel (1980) menyatakan standar untuk ikan laut segar yang baik mutunya mempunyai nilai TVN tidak lebih dari 30 mg persen dan TMA tidak lebih dari 15 mg persen.

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. BAHAN DAN ALAT

##### 1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah antarasa yang diperoleh dari Medan dan telah dikeringbekukan (*freeze drying*). Buah antarasa dihancurkan dan didestilasi untuk mendapatkan minyak atsirinya, kemudian diekstraksi dengan dua macam pelarut yaitu heksan dan etanol 70%. Untuk uji aktivitas antioksidan digunakan asam linoleat, buffer fosfat 0.1 M pH 7.0, air bebas ion, etanol absolut, etanol 75%, ammonium tiosianat 30%,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  20 mM, HCl 3.5%, BHT,  $\alpha$ -tokoferol, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil), dan metanol.

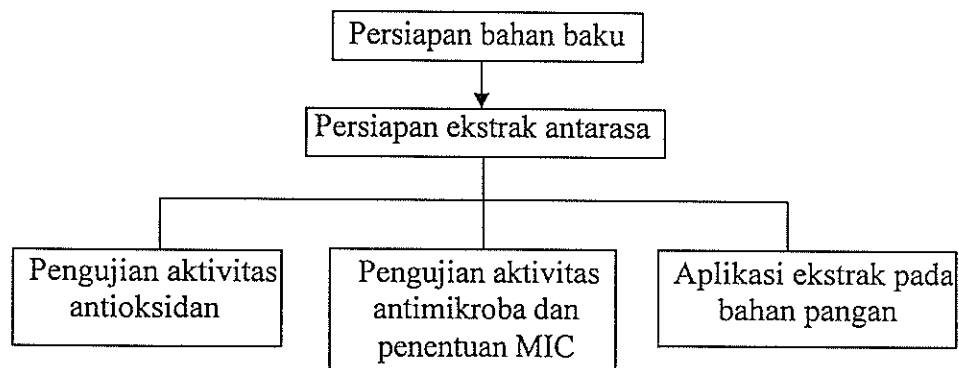
Pada uji difusi sumur digunakan beberapa kultur mikroba perusak dan patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* yang diperoleh dari Universitas Gajah Mada - Yogyakarta, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) dari Fakultas Kedokteran Hewan-IPB, dan *Pseudomonas aeruginosa* dari Laboratorium Mikrobiologi, TPG - IPB. Ekstrak dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO). Media uji mikroba yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Plate Count Agar* (PCA). Bahan-bahan lain yang mendukung untuk aplikasi adalah fillet ikan kakap merah yang diperoleh dari Hero Supermarket Bogor, plastik kemasan, emulsifier Tween 20, es, akuades, bahan-bahan kimia seperti *trichloroacetic acid* (TCA) 5%, NaOH 2 M, NaOH 0.01 M, HCl 0.01 M, dan formalin 16%.

##### 2. Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain shaker, sonikator, kertas saring, rotavapor, blender, timbangan, *freeze dryer*, spektrofotometer, inkubator, *coolbox*, *stomacher*, *chiller*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, *autoclave*, pipet mikro, bunsen bakar, jangka sorong, jarum ose, alat gelas, pH-meter, biuret, dan alat destilasi.

## B. METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan, yaitu persiapan bahan baku, persiapan ekstrak antarasa, dan tahapan analisis yang meliputi uji antioksidan, uji antimikroba, penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak antarasa terhadap mikroba uji, serta aplikasi ekstrak pada bahan pangan. Secara singkat tahapan proses penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.



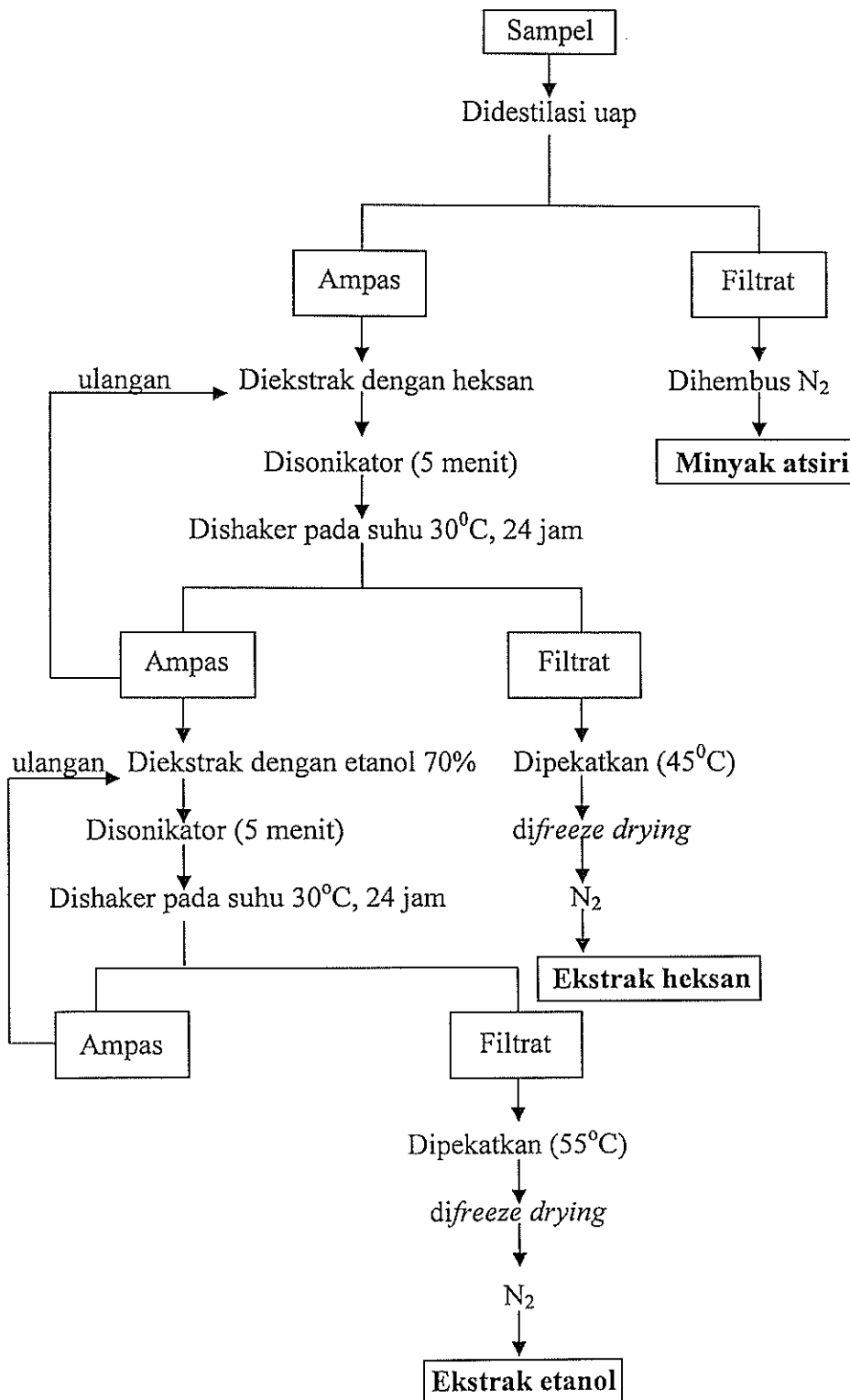
Gambar 3. Tahapan proses penelitian

### 1. Persiapan Bahan Baku dan Ekstrak Antarasa

Bahan baku buah antarasa yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Medan tidak dalam bentuk segar, melainkan sudah dikeringbekukan (*freeze drying*) untuk mengurangi kerusakan selama transportasi. Buah antarasa tersebut kemudian dihancurkan (diblender) sehingga diperoleh bubuk kasar antarasa.

Pada tahap awal, bubuk rempah ini didestilasi uap untuk mendapatkan minyak atsirinya. Ampas hasil destilasi kemudian diekstrak dengan metode maserasi (tanpa pemanasan) menggunakan pelarut heksan (non polar) dan etanol 70% (polar) secara berulang pada suhu 30°C. Filtrat yang didapatkan dirotavapor untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak. Ekstrak yang diperoleh kemudian dikeringbekukan dan dihembus gas N<sub>2</sub> untuk mengoptimalkan penguapan sisa pelarut. Rendemen minyak atsiri dan ekstrak rempah yang diperoleh dihitung, diamati kondisi fisiknya, dan selanjutnya digunakan sebagai sampel dalam penelitian utama. Tahapan

proses ekstraksi dengan metode maserasi dapat dilihat pada Gambar 4 berikut ini :



Gambar 4. Diagram alir proses ekstraksi dengan cara maserasi

## 1. Pengujian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba

### a. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode tiosianat (Chen *et al.*, 1995)

Sebanyak 200 ppm sampel ekstrak antioksidan dilarutkan dalam emulsi 2 ml asam linoleat 50 mM dalam etanol 99.5%, 2 ml buffer fosfat 0.1 M pH 7.0 dan 1 ml air bebas ion. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Setiap hari contoh diambil 50 µl untuk diuji dengan penambahan 2.35 ml etanol 75%, 50 µl ammonium tiosianat 30%, dan 50 µl FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 20 mM dalam HCl 3.5%. Warna merah akan terbentuk sebagai reaksi antara peroksida (hasil oksidasi asam linoleat) dengan ammonium tiosianat dan FeCl<sub>2</sub>. Setelah 3 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm.

Nilai pengukuran absorbansi dinyatakan sebagai bilangan peroksida dan aktivitas antioksidan tiap sampel dinyatakan dalam periode induksi (hari). Pengukuran aktivitas antioksidan juga dilakukan terhadap kontrol (tanpa penambahan antioksidan), sebagai pembanding digunakan BHT dan α-tokoferol. Perhitungan periode induksi diperoleh dari persamaan regresi linier masing-masing sampel antara lama penyimpanan dan nilai absorbansi.

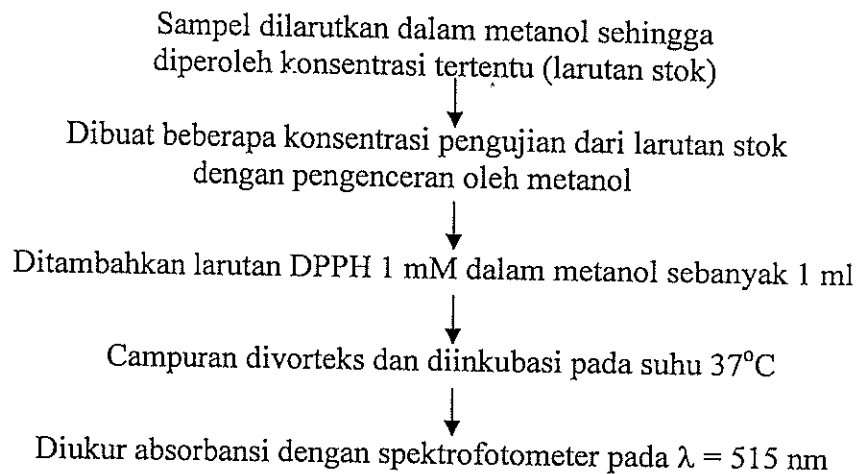
$$\text{Persamaan regresi linier : } y^* = Bx + A$$

\*Nilai y adalah 0.3 (ketetapan), nilai A dan B diketahui sehingga periode induksi (x) dapat dihitung.

### 2. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (Hatano *et al.*, 1988 dan Yen-Chen, 1995)

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ini berdasarkan pada DPPH *free radical scavenging activity*. Sampel ekstrak yang digunakan dalam metode ini adalah minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa. Sebagai pembanding digunakan BHT dan α-tokoferol. Secara lengkap metode tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.





Gambar 5. Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan bilangan  $IC_{50}$  (*Inhibition Concentration*). Dari nilai absorbansi sampel pada beberapa konsentrasi diperoleh persentase penghambatan (inhibisi). Persamaan garis diperoleh dari hubungan antara konsentrasi dan persentase inhibisi.

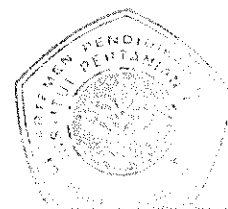
$$\text{Persamaan garis : } y^* = Bx + A$$

\*Nilai  $y = 50$  (penghambatan sebesar 50%), nilai A dan B diketahui sehingga x (nilai  $IC_{50}$ ) dapat dihitung.

### 3. Pengujian aktivitas antimikroba dengan metode difusi sumur (Garriga *et al.*, 1993)

Untuk melakukan analisa, kultur mikroba yang akan diuji harus disegarkan terlebih dahulu dengan menginokulasikan satu ose kultur murni dari agar miring *Nutrient Agar* (NA) ke dalam medium cair *Nutrient Both* (NB) sebanyak 10 ml secara aseptik. Kultur uji kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Media NA steril dipersiapkan dan didinginkan sampai suhu 50°C. Kultur uji dengan jumlah koloni sekitar  $10^7 - 10^8$  CFU/ml diinokulasikan sebanyak 0.2% ke dalam 20 ml media NA, sehingga jumlah koloni pada setiap cawan  $10^5 - 10^6$  CFU/ml. Setelah campuran media dan kultur uji membeku, dibuat lubang-lubang sumur (4 sumur per cawan)



dengan diameter 6 mm dan ke dalam 2 lubang sumur masing-masing diteteskan 60 µl ekstrak rempah 5% (w/v), 2 sumur lainnya kontrol positif (*amoxicillin* 0.05% w/v) dan kontrol negatif (DMSO). Cawan tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Areal penghambatan diukur berdasarkan diameter areal bening yang terbentuk di sekitar sumur, yaitu selisih antara diameter areal bening dengan diameter sumur.

### 3. Penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) Ekstrak Antarasa (Farag *et al.*, 1989)

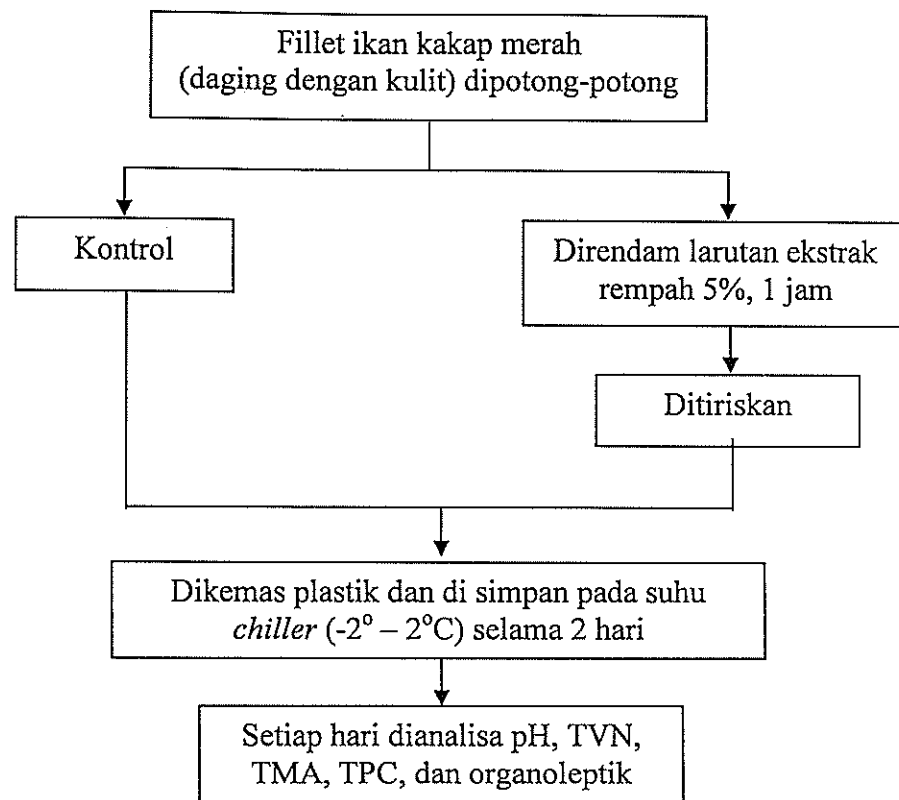
Metode penentuan MIC dilakukan dengan cara pembuatan agar cawan PCA yang mengandung ekstrak dengan kisaran konsentrasi 0; 5; 10; 15; 20 mg/ml media. Setelah agar membeku, di atas permukaan agar PCA dilakukan penggoresan suspensi bakteri yang telah disegarkan satu hari sebelumnya dalam media *Nutrient Broth* (NB) 10 ml. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, dilakukan pengamatan ada atau tidak adanya pertumbuhan bakteri uji. Selanjutnya dilakukan pembuatan agar cawan PCA yang mengandung ekstrak dengan selang konsentrasi lebih kecil lagi, yaitu 0.5 mg/ml media sehingga didapatkan konsentrasi terendah di mana bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dan konsentrasi ini dinyatakan sebagai nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*).

### 4. Aplikasi Ekstrak Antarasa pada Bahan Pangan

Ekstrak yang digunakan dalam aplikasi ini adalah minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa. Aplikasi ini ditujukan untuk melihat keefektifan ekstrak tersebut sebagai pengawet pada bahan pangan yang mudah rusak, contohnya pada ikan. Ikan yang digunakan adalah ikan kakap merah yang diaplikasikan tidak dalam bentuk ikan segar utuh, melainkan hanya diambil bagian daging dan kulitnya saja (fillet), dengan pertimbangan keterbatasan ekstrak antarasa yang diperoleh. Untuk menjaga kesegaran fillet ikan selama transportasi dari tempat pembelian ke laboratorium, maka fillet ditempatkan dalam *coolbox* berisi es curai.

Metode aplikasi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode perendaman dengan konsentrasi ekstrak 5% (w/v). Metode ini disesuaikan dengan metode aplikasi yang paling efektif berdasarkan hasil penelitian Mulyono (2003) yang menguji keefektifan ekstrak etil asetat (semi polar) antarasa pada fillet (daging tanpa kulit) ikan kakap merah. Karena media perendaman yang dibuat sebagian besar adalah air, maka untuk aplikasi ini digunakan bahan pengemulsi (*emulsifier*) agar ekstrak dan air dapat bercampur. Emulsifier yang digunakan adalah Tween 20 dengan konsentrasi 2% (w/w) dari total volume larutan yang akan dibuat. Volume larutan untuk perendaman dibuat 150 ml agar ikan bisa terendam dengan optimal.

Pada tahap ini, fillet ikan kakap merah dipotong-potong untuk kecukupan tiga kali analisa. Potongan fillet ikan tersebut direndam dalam larutan ekstrak 5% (w/v) selama 1 jam, kemudian ditiriskan, dikemas dalam plastik dan disimpan pada suhu *chiller* (-2° - 2°C) selama dua hari. Sebagai kontrol digunakan fillet ikan yang tidak direndam dan disimpan pada suhu yang sama. Analisa terhadap kontrol dan perlakuan perendaman dilakukan setiap hari (hari ke-0, 1, dan 2) yang meliputi pengukuran pH, kadar TVN dan TMA, perhitungan total mikroba/TPC, dan organoleptik (warna, aroma, dan tekstur). Secara garis besar tahapan aplikasi ini dapat dilihat pada Gambar 6 :



Gambar 6. Diagram alir aplikasi ekstrak antarasa

**a. Pengukuran derajat keasaman/pH (AOAC, 1995)**

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Sampel yang telah dipotong-potong halus dan homogen ditimbang sebanyak 5 gram dalam gelas piala, kemudian ditambahkan 20 ml akuades. Pengukuran dilakukan dengan memasukkan elektroda alat pH meter ke dalam sampel sambil dikocok dan nilai pH dapat dibaca langsung pada alat pH meter (digital). Sebelum digunakan, alat pH meter dikalibrasi terlebih dahulu dengan larutan buffer pH 4 dan pH 7.

**b. Uji Total Volatile Base Nitrogen/TVN dan Tri Methyl Amine/TMA (Apriyantono *et al.*, 1989)**

Sampel (ikan) dihancurkan dan ditimbang 5 gram, kemudian ditambahkan 15 ml larutan TCA (Trikloro asetat) 5% dan dicampur sampai homogen. Ekstrak TCA dipisahkan dengan cara penyaringan atau sentrifuse. Ekstrak tersebut diambil 5 ml dan dimasukkan ke

dalam alat destilasi Kjeldahl semimikro, kemudian ditambahkan 5 ml NaOH 2 M. Destilasi dilakukan dimana destilat ditangkap dengan 15 ml HCl 0,01 M standar. Ditambahkan beberapa tetes indikator merah metil-metilen blue ke dalam destilat, lalu dititrasi dengan NaOH 0,01 M standar sampai tercapai titik akhir. Ditambahkan 1 ml formaldehid 16 % untuk setiap 10 ml campuran sesudah titrasi yang pertama, dikocok, kemudian dititrasi lagi dengan NaOH 0,01 M standar.

Perhitungan :

$$\text{TVN (mg/100 g)} = \frac{14 (15 + W) \times (15 - V_1) \times 0.01}{5} \times \frac{100}{M}$$

$$\text{TMA (mg/100 g)} = \frac{14 (15 + W) \times V_2 \times 0.01}{5} \times \frac{100}{M}$$

Keterangan :

- 14 = bobot atom Nitrogen
- $V_1$  = volume NaOH 0.01 M yang dibutuhkan untuk titrasi 1
- $V_2$  = volume NaOH 0.01 M yang dibutuhkan untuk titrasi 2
- M = berat sampel (gram)
- W = jumlah air yang ada dalam bahan (gram)

**c. Uji total mikroba/Total Plate Count (Fardiaz, 1987)**

Sebanyak 5 gram contoh ditimbang, kemudian ditambahkan 45 ml larutan NaCl steril, dimasukkan ke dalam *stomacher* dan dihancurkan sampai homogen sehingga diperoleh larutan dengan pengenceran  $10^{-1}$ . Dari larutan contoh diambil 1 ml dengan menggunakan pipet steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi 9 ml larutan NaCl steril sehingga diperoleh larutan dengan pengenceran  $10^{-2}$ . Pengenceran berikutnya dilakukan dengan cara serupa yaitu dengan pengambilan 1 ml larutan hasil pengenceran sebelumnya, lalu dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl steril sehingga diperoleh larutan dengan pengenceran  $10^{-3}$  dan seterusnya.

Untuk pemupukan, dari hasil pengenceran diambil 1 ml sampel dengan pipet steril dan dipindahkan ke dalam dua cawan petri steril (duplo). Kemudian setiap cawan petri ditambahkan sekitar 15 ml media PCA steril yang tersedia dan digoyang-goyangkan hingga merata. Setelah media menjadi beku, cawan petri disimpan dengan kondisi terbalik di dalam inkubator bersuhu 37°C selama 48 jam.

Perhitungan jumlah mikroba dilakukan pada setiap cawan untuk tiap tingkat pengenceran. *Total Plate Count* (TPC) dihitung berdasarkan metode *Standar Plate Count* (SPC) di mana ketentuannya yaitu : perhitungan dilakukan jika jumlah koloni tiap cawan antara 30-300, dan tingkat pengenceran diperhitungkan dengan membandingkan jumlah koloni pada tingkat pengenceran tertinggi dan terendah.

Jika perbandingan jumlah koloni antara pengenceran tertinggi dan terendah kurang atau sama dengan 2 ( $\leq 2$ ), maka ditentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhatikan pengencerannya. Apabila hasil perbandingan antara pengenceran tertinggi dan terendah lebih dari 2 ( $> 2$ ), maka diambil jumlah koloni dari pengenceran terendah. Jika semua pengenceran menghasilkan jumlah koloni  $< 30$ , maka hanya koloni pada pengenceran terendah yang dihitung sedangkan jika jumlah koloni  $> 300$ , maka hanya koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung.

#### **d. Uji organoleptik**

Uji organoleptik dilakukan terhadap sampel secara visual meliputi warna, aroma/bau, dan tekstur dengan mengamati perubahan yang terjadi pada sampel selama penyimpanan.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. PERSIAPAN BAHAN BAKU DAN EKSTRAK ANTARASA

Buah antarasa tidak dapat disimpan lama atau cepat busuk, karena itu untuk memperpanjang umur simpannya antarasa yang diperoleh dari Medan sudah dalam bentuk kering beku dengan kadar air 5.21% bk (berat kering). Kondisi kering beku ini akan memudahkan dalam proses ekstraksi dan tidak mengurangi atau merusak komponen volatil pada bahan, sehingga aroma rempah masih terjaga.

Sebelum diekstraksi, buah antarasa yang telah kering dihancurkan dengan menggunakan blender untuk memperoleh bentuk serbuk. Pembuatan serbuk ini dimaksudkan untuk memperkecil dan menyeragamkan ukuran partikelnya agar mempermudah kontak antara bahan dengan pelarutnya, sehingga ekstraksi dapat berlangsung dengan baik. Bombardelli (1991) menambahkan bahwa ukuran partikel yang seragam berpengaruh kepada pengeluaran senyawa aktif yang seragam dari serbuk bahan pada tahap ekstraksi. Secara teoritis jika ukuran partikel lebih kecil maka waktu yang dibutuhkan untuk proses ekstraksi menjadi lebih singkat sampai batas tertentu.

Tahap ekstraksi awal yang dilakukan adalah penyulingan/destilasi uap untuk mendapatkan minyak atsiri yang mengandung komponen volatil. Komponen volatil minyak atsiri dari berbagai jenis rempah-rempah telah terbukti mempunyai sifat sebagai antioksidan dan antimikroba. Ampas bahan sisa destilasi selanjutnya diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya. Hal ini dilakukan dengan tujuan agar zat ekstraktif yang belum diketahui sifat-sifatnya dapat terekstrak secara optimal pada salah satu jenis pelarut yang digunakan.

Beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh pelarut untuk mengekstrak bahan alam seperti rempah-rempah antara lain tidak berbau dan tidak berasa sehingga tidak mempengaruhi mutu produk akhir, mudah berpenetrasi karena viskositasnya rendah sehingga efisiensi ekstraksi tinggi, mudah dipisahkan tanpa meninggalkan residu sehingga produk dapat bebas dari pelarut, dan dapat digunakan secara selektif dengan berbagai kondisi suhu

dan tekanan ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak yang bermutu baik. Ekstraksi dilakukan secara berurutan menggunakan pelarut non polar (heksan) dan pelarut polar (etanol 70%).

Menurut beberapa penelitian, pelarut polar yang sangat efektif untuk mengekstraksi komponen aktif dari bahan alam adalah metanol, tetapi metanol merupakan senyawa yang toksik apabila terhisap maupun terserap pada permukaan kulit. Oleh sebab itu metanol tidak diijinkan digunakan dalam bahan pangan. Pemilihan etanol sebagai pelarut polar pada penelitian ini didasarkan pada pertimbangan bahwa etanol adalah pelarut yang cukup aman dan tidak membahayakan jika ekstrak diaplikasikan pada bahan pangan dan ternyata meninggalkan residu dalam bahan pangan tersebut. Batas residu etanol yang diijinkan dalam makanan adalah 30 ppm (Farrel, 1990). Selama proses ekstraksi diharapkan pelarut etanol dapat menguap sempurna pada saat penghilangan pelarut dengan rotavapor dan dihembus gas N<sub>2</sub> untuk mengoptimumkan penguapan sisa pelarut, sehingga tidak ada residu yang tertinggal.

Masing-masing pelarut memiliki efisiensi dan selektifitas yang berbeda dalam melarutkan senyawa-senyawa tertentu. Pelarut non polar (heksan) akan dapat melarutkan senyawa yang non polar seperti lilin, lemak, terpenoid dan pelarut polar (etanol) akan melarutkan senyawa polar seperti tanin, fenolik, gula, dan asam amino tertentu.

Proses ekstraksi akan lebih cepat jika dilakukan pada suhu tinggi. Namun hal ini dapat mengakibatkan beberapa komponen yang terdapat dalam rempah-rempah akan rusak. Menurut Bombardelli (1991) semakin lama waktu ekstraksi maka kesempatan untuk terjadinya kontak antara bahan dengan pelarut semakin besar sehingga rendemen akan bertambah sampai titik jenuh kelarutan. Karena itu proses ekstraksi dalam penelitian ini dilakukan secara maserasi pada suhu 30°C sebanyak tiga kali ulangan. Rendemen dan karakteristik ekstrak yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.



Tabel 2. Data rendemen dan karakteristik ekstrak antarasa

Jenis ekstrak	Berat bahan (g)	Berat ekstrak (g)	Volume ekstrak (ml)	Rendemen (w/w)*	Karakteristik	
					Warna	Aroma
Minyak atsiri	618.20	20.81	23.10	3.37%	Kuning terang	Lemon
Ekstrak heksan	326.40	10.96	-	3.36%	Hijau pekat	Khas antarasa
Ekstrak etanol	319.60	22.62	-	7.08%	Coklat kehitaman	Khas

\*Rendemen dihitung berdasarkan berat bahan tiap tahapan ekstraksi

Nilai rendemen untuk ekstrak polar (etanol) lebih tinggi dibandingkan dengan minyak atsiri dan ekstrak non polar (heksan). Hal ini dapat disebabkan oleh keberadaan komponen polar dalam bahan yang dapat terekstrak oleh etanol lebih banyak dibandingkan dua komponen lainnya.

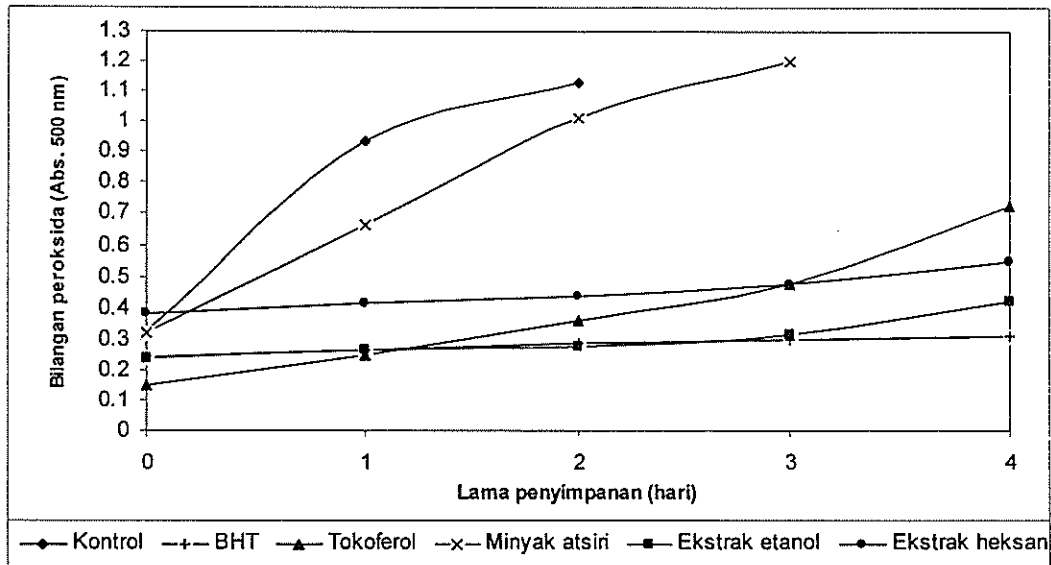
## B. AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

Ekstrak antarasa yang telah diperoleh diuji aktivitas antioksidan dengan dua metode, yaitu metode tiosianat dan metode DPPH. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak antarasa dalam menghambat terjadinya oksidasi yang menyebabkan terbentuknya radikal bebas.

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode tiosianat didasarkan pada prinsip penghambatan senyawa antioksidan terhadap senyawa radikal (peroksida) yang terbentuk dari proses oksidasi asam linoleat. Adanya antioksidan dalam sampel linoleat akan menghambat terjadinya oksidasi sehingga jumlah peroksida yang terbentuk dapat dikurangi.

Pada uji ini digunakan sampel ekstrak minyak atsiri, ekstrak heksan, dan ekstrak etanol antarasa sebanyak 200 ppm sebagai senyawa antioksidan. Sebagai pembanding digunakan kontrol tanpa penambahan antioksidan, BHT, dan  $\alpha$ -tokoferol. Konsentrasi 200 ppm yang digunakan ini berdasarkan batas maksimum penggunaan antioksidan sintetik pada bahan pangan. Bilangan peroksida dihitung berdasarkan nilai absorbansi sampel pada panjang

gelombang 500 nm. Nilai absorbansi sampel secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 1. Bilangan peroksida sampel selama penyimpanan pada umumnya mengalami peningkatan. Kurva kenaikan bilangan peroksida tersebut dapat dilihat pada Gambar 7.



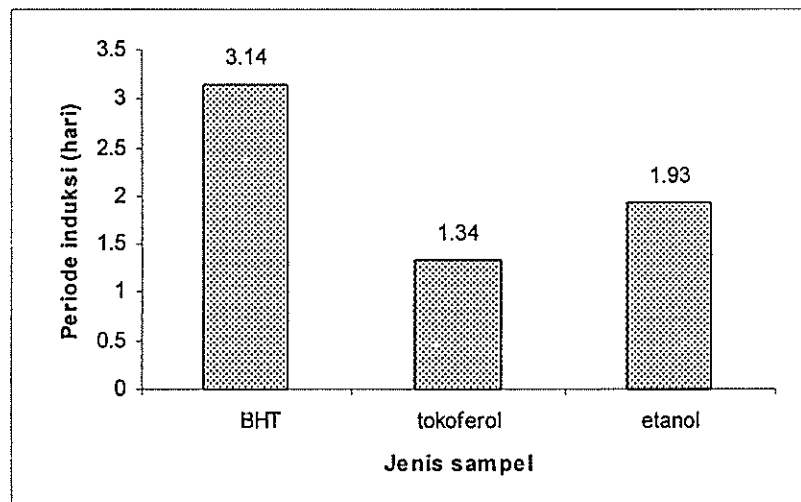
Gambar 7. Kurva kenaikan bilangan peroksida masing-masing sampel pada konsentrasi 200 ppm selama waktu penyimpanan

Nilai absorbansi yang rendah menunjukkan jumlah peroksida yang dihasilkan juga rendah, sehingga zat antioksidan dapat dikatakan aktif. Menurut Chen *et al.* (1995) jika absorbansi sudah melebihi 0.3 berarti antioksidan sudah tidak mampu lagi mempertahankan reaksi oksidasi dari asam linoleat dan dianggap sudah rusak. Aktivitas dari zat antioksidan dalam uji tiosianat dinyatakan dengan periode induksi. Nilai periode induksi dapat dihitung dari nilai absorbansi dan lamanya penyimpanan. Semakin lama periode induksi berarti zat antioksidan mampu memperpanjang ketahanan asam linoleat dari serangan oksidasi dan ini berarti zat antioksidan semakin aktif. Periode induksi masing-masing sampel dapat dilihat pada Lampiran 2.

Nilai absorbansi 0.3 pada awal penyimpanan telah tercapai untuk kontrol, minyak atsiri dan ekstrak heksan antara lain, ini berpengaruh pada nilai regresi liniernya sehingga periode induksi ketiga sampel tersebut bernilai negatif. Nilai negatif menunjukkan bahwa sampel tidak mampu menghambat

reaksi oksidasi asam linoleat, sehingga minyak atsiri dan ekstrak heksan antarasa dinyatakan tidak memiliki aktivitas sebagai zat antioksidan (tidak aktif).

Nilai absorbansi yang melebihi 0.3 pada awal penyimpanan kemungkinan juga dapat disebabkan oleh asam linoleat yang sudah teroksidasi sebelum digunakan untuk pengujian. Nilai periode induksi dari sampel BHT,  $\alpha$ -tokoferol, dan ekstrak etanol antarasa dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Histogram periode induksi BHT,  $\alpha$ -tokoferol dan ekstrak etanol antarasa

Pada gambar 8 terlihat BHT berkemampuan memperpanjang periode induksi lebih dari 3 hari. Untuk emulsi asam linoleat yang ditambah  $\alpha$ -tokoferol hanya dapat menghambat asam linoleat dari proses oksidasi lebih dari 1 hari. Periode induksi untuk emulsi yang ditambah ekstrak etanol antarasa ternyata melebihi periode induksi dari  $\alpha$ -tokoferol (mendekati 2 hari), walaupun masih lebih rendah dari BHT. Adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol bisa disebabkan senyawa fenolik yang merupakan komponen bioaktif dan umumnya berifat antioksidan bersifat polar sehingga larut dalam etanol. Senyawa fenolik dapat menghambat proses oksidasi dengan cara memberikan atom H yang akan mengikat gugusan peroksida menghasilkan senyawa yang lebih stabil.

Menurut Houghton dan Raman (1998) komponen fenolik yang umumnya terdapat dalam tanaman berada dalam bentuk fenol bebas dan glikosidik. Senyawa fenolik mengandung banyak gugus OH sehingga cenderung relatif polar. Antioksidan dari rempah-rempah mempunyai efektivitas yang berbeda pada substrat yang berbeda. Antioksidan rempah-rempah sebagian besar lebih aktif dalam pelarut alkohol dibanding pelarut organik lainnya. Diduga sebagian besar antioksidan dari rempah-rempah bersifat polar karena mudah larut dalam pelarut polar. Dari beberapa hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak polar antioksidan menghasilkan aktivitas tertinggi. Hasil penelitian Prasetyawati (2003) tentang aktivitas antioksidan oleoresin jahe yang diekstrak dengan metanol menunjukkan aktivitasnya lebih kuat daripada  $\alpha$ -tokoferol.

Uji aktivitas antioksidan juga dilakukan dengan metode DPPH. Metode ini berbeda dengan metode tiosianat. Pada metode ini senyawa antioksidan diuji efektivitasnya dalam meredam aktivitas DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang bilamana masuk dalam tubuh manusia dan tidak terkontrol dapat menyebabkan kerusakan fungsi sel.

Jika DPPH ditambahkan dengan senyawa antioksidan akan terjadi reaksi yang menyebabkan radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil) diubah menjadi 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazine yang stabil. Banyak senyawa yang mampu meredam/menghambat radikal bebas, tetapi suatu senyawa dapat digunakan sebagai peredam radikal bebas yang bermanfaat apabila setelah bereaksi dengan radikal bebas akan menghasilkan radikal baru yang stabil atau senyawa bukan radikal.

Apabila suatu senyawa mempunyai kemampuan sebagai peredam radikal bebas, pada pengujian dengan larutan DPPH akan memberikan pemucatan warna pereaksi DPPH (berwarna ungu) menjadi kuning. Untuk mengetahui berapa besar daya peredamannya maka dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer.

Pengukuran absorbansi dilakukan pada setiap sampel antioksidan yang dibuat dengan berbagai konsentrasi. Secara teoritis semakin tinggi konsentrasi

antioksidan yang ditambahkan pada larutan DPPH, nilai absorbansi akan semakin turun karena warna larutan bertambah kuning. Peredaman (inhibisi) terhadap radikal bebas dinyatakan dalam persen, dan aktivitas antioksidan dinyatakan dengan  $IC_{50}$  (*Inhibition Concentration*) yang menunjukkan konsentrasi sampel antioksidan yang dapat menghambat/meredam aktivitas DPPH sebesar 50%. Nilai  $IC_{50}$  yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi. Dalam penelitian ini, aktivitas antioksidan dengan metode DPPH diujikan pada minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa, sedangkan sebagai pembanding digunakan BHT dan  $\alpha$ -tokoferol. Hasil pengukuran absorbansi dari masing-masing sampel dapat dilihat pada Lampiran 3 – 8, sedangkan nilai  $IC_{50}$  dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai  $IC_{50}$  dari masing-masing sampel antioksidan

Sampel	$IC_{50}$ jam ke- (ppm)					
	0	1	2	3	4	5
BHT	34.658	32.557	34.066	31.125	30.054	31.753
$\alpha$ -tokoferol	34.124	34.536	33.954	29.518	28.732	27.688
Minyak atsiri 1	Tidak Aktif					
Minyak atsiri 2	Tidak Aktif		Tidak dihitung			
Ekstrak etanol 1	624.508	463.274	Tidak Aktif	329.1	334.302	Tidak dihitung
Ekstrak etanol 2	Tidak Aktif	843.759	713.012	493.031	433.384	Tidak dihitung

Antioksidan dinyatakan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50. Terlihat pada hasil pengujian untuk standar BHT dan  $\alpha$ -tokoferol aktivitas antioksidannya sangat kuat, walaupun nilai  $IC_{50}$  berfluktuasi untuk pengamatan pada jam ke-0 sampai jam ke-5. Fluktuasi nilai  $IC_{50}$  ini dapat disebabkan oleh kelarutan senyawa aktif yang berbeda setiap jam. Pada jam ke-1 nilai  $IC_{50}$  lebih rendah dari jam ke-0 dan meningkat lagi pada jam ke-2, karena kelarutan senyawa aktif dalam media bertambah pada jam ke-1 sehingga aktivitas DPPH dapat dihambat, selanjutnya pada jam ke-2 aktivitas

DPPH meningkat lagi. Semakin lama penyimpanan, nilai  $IC_{50}$  untuk standar mendekati stabil (jam ke-4 sampai ke-5) walaupun masih berfluktuasi tetapi tidak terlalu signifikan. Kondisi ini diduga akan tetap jika penyimpanan dilanjutkan lebih lama sehingga pengukuran sampel dilakukan sampai jam ke-4.

Dari hasil pengujian dinyatakan minyak atsiri antarasa tidak aktif karena nilai  $IC_{50}$  berdasarkan perhitungan sangat besar dan dapat melebihi 1000 ppm. Ekstrak etanol antarasa selama penyimpanan pada umumnya memiliki nilai  $IC_{50}$  di atas 200 ppm. Suatu senyawa antioksidan dengan  $IC_{50}$  antara 151-200 ppm sudah dinyatakan memiliki aktivitas yang lemah, sehingga ekstrak etanol antarasa yang memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih dari 200 ppm dinyatakan sangat lemah aktivitasnya atau dapat juga dinyatakan tidak aktif.

Metode tiosianat dan metode DPPH merupakan dua metode yang dapat digunakan untuk pengujian antioksidan dari beberapa metode yang ada. Efektivitas relatif antioksidan tergantung dari substrat lipid, sistem uji, konsentrasi, waktu oksidasi dan metode yang digunakan untuk menentukan oksidasi lipid. Kelarutan komponen antioksidan juga dapat mempengaruhi aktivitasnya. Komponen antioksidan yang bersifat relatif polar akan mudah larut di dalam sistem uji yang bersifat relatif polar. Demikian pula sebaliknya, bila komponen antioksidan bersifat relatif tidak polar, maka akan sukar larut dalam sistem yang bersifat relatif polar dan aktivitasnya sebagai antioksidan menjadi tidak optimal. Perbedaan hasil pada metode tiosianat dan metode DPPH bisa terjadi karena faktor-faktor di atas.

### C. AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN NILAI MIC

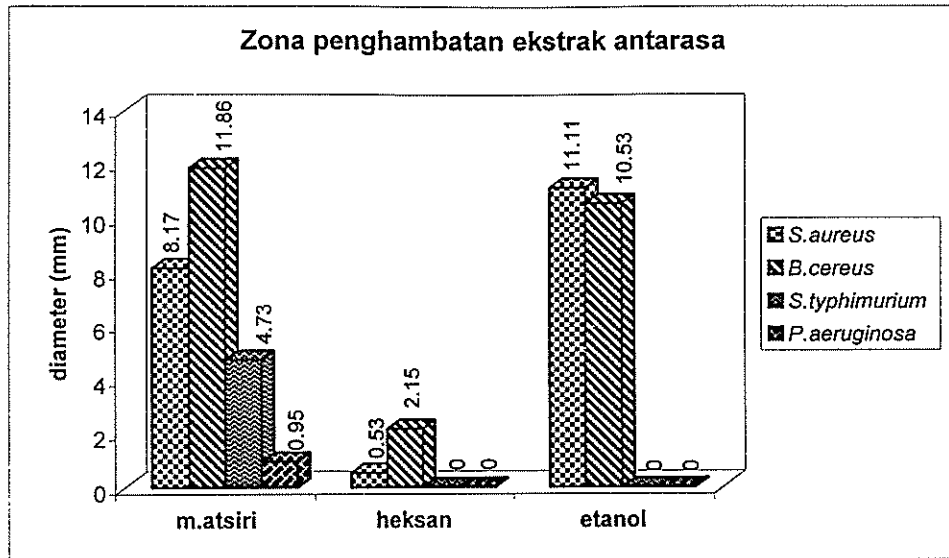
Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi sumur terhadap beberapa jenis bakteri yang tergolong sebagai bakteri patogen dan perusak bahan pangan, yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, yang merupakan golongan bakteri gram positif dan *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, yang merupakan golongan bakteri gram negatif. Persiapan ekstrak antarasa untuk uji ini dilakukan dengan melarutkan masing-masing ekstrak yang diperoleh ke dalam pelarut dimetil sulfoksida (DMSO)

dengan konsentrasi 5% (w/v). Jumlah koloni masing-masing bakteri uji pada setiap cawan berkisar antara  $10^5$  -  $10^6$  CFU/ml.

Penggunaan DMSO sebagai pelarut ekstrak didasarkan pada asumsi bahwa DMSO memiliki gugus polar dan non polar yang diharapkan mampu berdifusi pada media agar untuk membawa komponen antimikroba yang terdapat pada minyak atsiri, ekstrak heksan maupun ekstrak etanol antarasa. Pengaruh dimetil sulfoksida (DMSO) terhadap mikroba uji perlu diteliti sebagai kontrol negatif, yaitu dengan menambahkan pelarut DMSO dalam jumlah yang sama dengan ekstrak (60  $\mu$ l) ke dalam lubang sumur. Apabila DMSO ini berpengaruh dalam penghambatan mikroba uji, maka hasilnya harus diperhitungkan terhadap penghambatan oleh ekstrak. Dari hasil pengamatan ternyata pengaruh DMSO terhadap mikroba uji tidak ada, sehingga hasilnya dapat diabaikan.

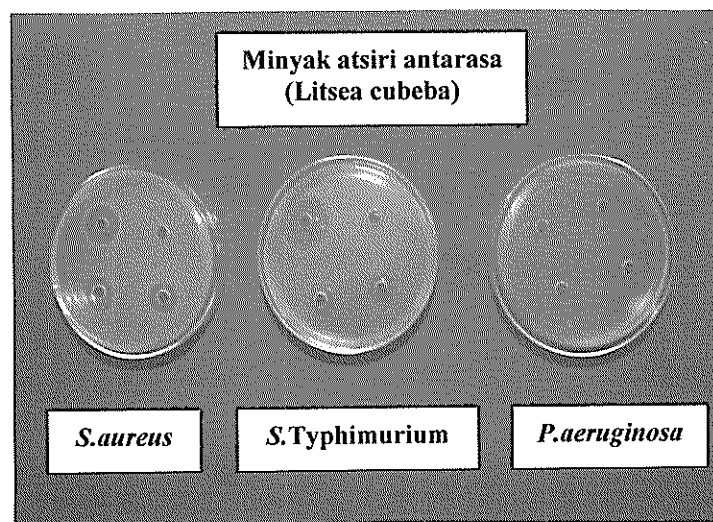
Sementara itu sebagai kontrol positif digunakan antibiotik *amoxicillin* yang dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 0.05% (w/v). Adanya kontrol positif ini dimaksudkan untuk membandingkan aktivitas antimikroba dari ekstrak antarasa dengan antibiotik sintetik. Penggunaan *amoxicillin* juga didasarkan karena antibiotik ini mempunyai sifat berspektrum luas, yaitu antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif. Hasil uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi sumur dapat dilihat pada Lampiran 9.

Pengujian aktivitas antimikroba dengan metode difusi sumur menunjukkan bahwa minyak atsiri antarasa pada umumnya mampu menghambat semua bakteri uji (Gambar 9). Hal ini berarti minyak atsiri antarasa mempunyai spektrum yang luas sebagai zat antimikroba. Diduga mekanisme aktivitas antimikroba dari komponen minyak atsiri (karvakrol, sitral, dan geraniol) adalah mengganggu lapisan fosfolipid dari membran sel yang menyebabkan peningkatan permeabilitas dan kehilangan unsur yang menyusun sel.



Gambar 9. Aktivitas antimikroba ekstrak antarasa

Minyak atsiri antarasa memiliki areal penghambatan terbesar pada *Bacillus cereus* yaitu 11.86 mm dan terkecil pada *Pseudomonas aeruginosa*, 0.95 mm. Areal penghambatan minyak atsiri antarasa terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Gambar 10.



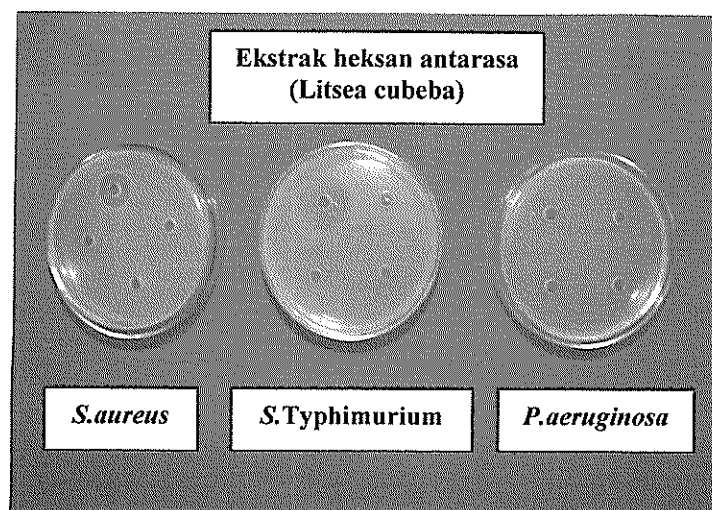
Gambar 10. Areal penghambatan minyak atsiri antarasa pada bakteri uji

Pada umumnya ekstrak heksan antarasa memiliki diameter penghambatan paling kecil pada bakteri uji (*S. aureus* dan *B. cereus*)



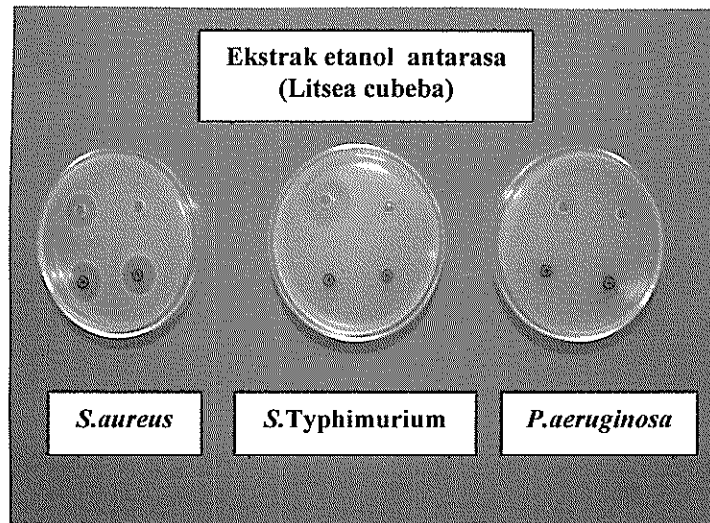
dibandingkan minyak atsiri dan ekstrak etanol. Diameter penghambatan ekstrak heksan pada *S.aureus* adalah 0.53 mm, *B.cereus* 2.15 mm, sedangkan pada *S.Typhimurium* dan *P.aeruginosa* tidak menunjukkan adanya penghambatan (Gambar 11). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa aktivitas antimikroba terhadap mikroba uji menunjukkan setiap jenis mikroba mempunyai kepekaan yang berbeda satu dengan lainnya tergantung dari jenis mikroba dan jenis ekstrak yang diujikan.

Menurut Sikkema *et al.* (1995), senyawa antimikroba yang diuji dengan metode difusi sumur sebaiknya tidak terlalu banyak mengandung gugus hidrofobik, karena akan mengganggu kemampuan senyawa tersebut untuk berdifusi dalam medium agar. Proses difusi yang terganggu akan mengakibatkan daya penghambatannya tidak terdeteksi. Komponen ekstrak non polar banyak memiliki gugus hidrofobik, sehingga kemampuan untuk berdifusi di dalam medium agar menjadi berkurang. Untuk menjaga keseimbangan gugus hidrofobik dengan hidrofilik maka diperlukan suatu gugus lipofilik. Sifat hidrofilik dibutuhkan agar zat antimikroba dapat larut di dalam air yang merupakan tempat tumbuh mikroba, sedangkan karakteristik lipofilik diperlukan agar zat tersebut dapat bereaksi dengan membran mikroba.



Gambar 11. Areal penghambatan ekstrak heksan antarasa pada bakteri uji

Pengujian aktivitas antimikroba pada ekstrak etanol antarasa memberikan hasil yang positif terhadap *S.aureus* dan *B. cereus*. Diameter penghambatan pada *S.aureus* adalah 11.11 mm dan pada *B.cereus* 10.53 mm, sedangkan pada *S.Typhimurium* dan *P.aeruginosa* tidak terbentuk areal penghambatan seperti terlihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Areal penghambatan ekstrak etanol antarasa pada bakteri uji

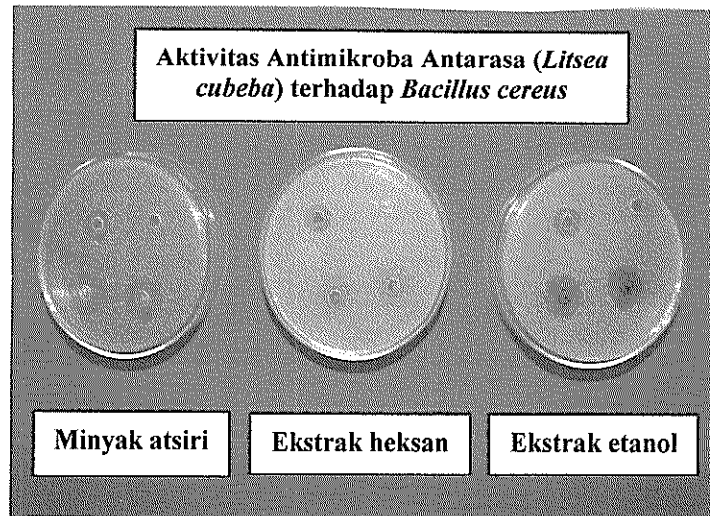
Secara umum hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak antarasa ini menunjukkan bahwa bakteri uji dari golongan bakteri gram positif lebih sensitif terhadap senyawa antimikroba dibandingkan bakteri gram negatif. Ketahanan bakteri terhadap senyawa antimikroba berhubungan erat dengan struktur dinding selnya. *S.aureus* dan *B.cereus* adalah bakteri gram positif di mana dinding selnya sebagian besar (90%) terdiri dari lapisan peptidoglikan dan lapisan tipis asam teikoat (Fardiaz, 1989). Asam teikoat menyebabkan permukaan sel bakteri gram positif bersifat polar dan mempunyai muatan negatif. Sifat ini akan mempengaruhi laju penetrasi molekul-molekul ionik ke dalam sel yang akhirnya mungkin dapat menyebabkan kebocoran sel.

*S.Typhimurium* dan *P.aeruginosa* adalah bakteri gram negatif di mana dinding selnya lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri gram positif. Bakteri gram positif hanya mempunyai satu lapisan membran yang mengandung peptidoglikan sedangkan bakteri gram negatif mempunyai membran dalam dan membran luar. Lapisan membran luar (*outer wall layer*)

mengandung posfolipid, lipopolisakarida dan lipoprotein. Lapisan ini bersifat impermeabel terhadap molekul besar tetapi dapat melalukan molekul kecil. Lipopolisakarida dan peptidoglikan merupakan saringan bagi berbagai ukuran molekul, sedangkan plasma membran bersifat impermeabel bagi molekul yang ukurannya jauh lebih kecil (Lay dan Hastowo, 1992).

*S.Typhimurium* adalah bakteri gram negatif yang cukup sensitif terhadap minyak atsiri antarasa dibandingkan dengan *P.aeruginosa*. Diameter penghambatan minyak atsiri antarasa terhadap *S.Typhimurium* adalah 4.73 mm sedangkan pada *P.aeruginosa* 0.95 mm. Perbedaan ketahanan berbagai jenis bakteri gram negatif dapat juga disebabkan oleh perbedaan permukaan selnya. Menurut Russel (1990), bakteri gram negatif dengan permukaan sel yang licin bersifat hidrofilik dan permukaan sel yang kasar bersifat hidrofobik. Sifat inilah yang kemungkinan menyebabkan ketahanan *S.Typhimurium* dan *P.aeruginosa* berbeda.

Hasil pengujian juga menunjukkan bahwa semua ekstrak antarasa mampu dengan baik menghambat bakteri *B.cereus* yang dapat membentuk spora. Menurut Russel (1990) kepekaan *B.cereus* terhadap aktivitas antimikroba karena pada masa germinasi maupun pertumbuhan spora dapat kehilangan daya tahannya terhadap pengaruh panas, radiasi, tekanan, kekeringan dan beberapa senyawa kimia, sehingga ketahanannya sama dengan sel vegetatifnya. Senyawa antimikroba ada yang mempengaruhi proses germinasi spora namun ada juga yang mempengaruhi pertumbuhan spora. Aktivitas antimikroba ekstrak antarasa terhadap *B.cereus* dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13 . Areal penghambatan ekstrak antarasa pada *Bacillus cereus*

Aktivitas antimikroba *amoxicillin* 0.05% (w/v) (kontrol positif) terhadap semua bakteri uji ditunjukkan dengan terbentuknya diameter penghambatan pada semua cawan (Lampiran 9). Dari hasil ini terlihat bahwa *amoxicillin* mempunyai sifat spektrum yang luas karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif. Jika dibandingkan dengan minyak atsiri antarasa yang juga mampu menghambat semua bakteri uji, *amoxicillin* jauh lebih efektif. Pada *S.aureus* misalnya, *amoxicillin* dengan konsentrasi 100 kali lebih kecil mempunyai diameter penghambatan 1.48 kali lebih besar. Hal ini dapat terjadi karena *amoxicillin* merupakan zat murni, sedangkan minyak atsiri antarasa masih mengandung berbagai komponen volatil di dalamnya.

Setelah diketahui bahwa minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa mempunyai efektivitas antimikroba yang cukup besar pada bakteri uji terutama bakteri gram positif, selanjutnya dilakukan penentuan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) kedua jenis ekstrak untuk mengetahui nilai konsentrasi terendah dari ekstrak tersebut yang dapat meniadakan pertumbuhan bakteri selama waktu inkubasi 24 jam. Metode analisis yang digunakan untuk menentukan nilai MIC ini adalah metode penggosresan pada agar cawan (Frag *et al.*, 1989).

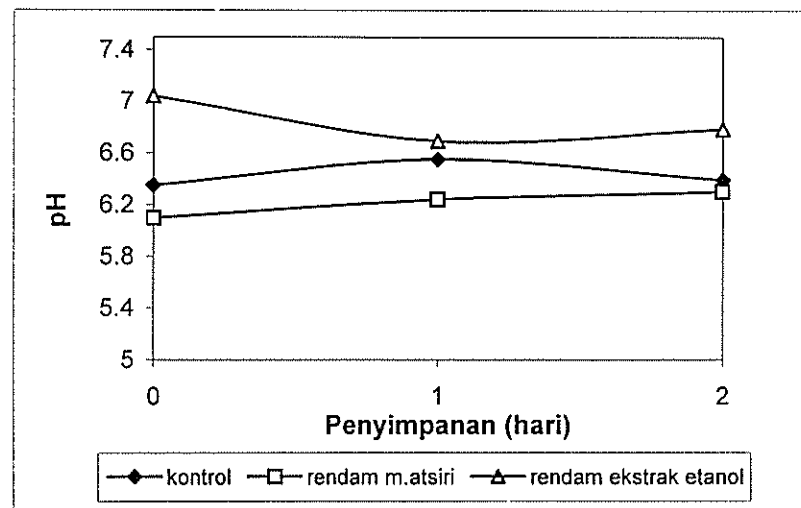
Nilai MIC yang kecil menandakan bakteri uji lebih sensitif terhadap senyawa antimikroba. Hasil pengujian menunjukkan nilai MIC minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa terhadap *S.aureus* adalah 0.5 mg/ml (0.05% w/v), sedangkan nilai MIC minyak atsiri pada *B.cereus* adalah 3 mg/ml (0.3% w/v) dan 0.5 mg/ml untuk ekstrak etanol antarasa. Nilai MIC minyak atsiri untuk *S.Typhimurium* adalah 3 mg/ml (Lampiran 10). Penentuan nilai MIC ekstrak etanol antarasa terhadap *S.Typhimurium* dan minyak atsiri pada *P.aeruginosa* tidak dilakukan karena diameter penghambatan yang ditunjukkan dengan metode difusi sumur pada konsentrasi ekstrak 5% (w/v) relatif kecil.

#### D. APLIKASI EKSTRAK ANTARASA PADA BAHAN PANGAN

Tahapan aplikasi ini dilakukan untuk mengetahui keefektifan ekstrak antarasa apabila digunakan pada bahan pangan sebagai pengawet alami. Bahan pangan yang digunakan adalah fillet ikan kakap merah, yaitu daging ikan tanpa duri dan tulang. Fillet lebih rentan terhadap kontaminasi dan penurunan mutu dibandingkan ikan utuh. Fillet ikan ada yang masih dengan kulit (*skin on fillet*) dan ada pula yang tanpa kulit (*skinless fillet*). Dalam penelitian ini digunakan daging fillet yang masih dengan kulit. Aplikasi dilakukan dengan memberikan perlakuan perendaman pada potongan fillet ikan sebelum disimpan pada *chiller* (-2° - 2°C). Kondisi penyimpanan ini didasarkan pada kebiasaan konsumen yang selalu menyimpan ikan pada bagian *chiller* sebelum digunakan. Metode aplikasi dilakukan berdasarkan pada hasil penelitian Mulyono (2003) yang merendam daging ikan kakap merah dengan larutan ekstrak etil asetat (semipolar) antarasa 5% (w/v) sebelum dilakukan penyimpanan.

Pada penelitian ini fillet ikan kakap merah direndam dalam dua larutan ekstrak, minyak atsiri antarasa 5% (w/v) dan ekstrak etanol antarasa 5% (w/v) selama 1 jam kemudian ditiriskan dan dikemas dalam plastik. Penyimpanan dalam *chiller* dan analisa dilakukan selama dua hari. Lama penyimpanan yang relatif singkat ini disebabkan oleh ketersediaan ekstrak yang terbatas, jika analisa dilakukan lebih lama maka jumlah sampel dan larutan ekstrak yang dibutuhkan akan lebih banyak. Dalam penelitian ini akan dilihat keefektifan

ekstrak sebagai bahan pengawet apabila dibandingkan dengan kontrol selama penyimpanan dua hari. Analisa terhadap sampel dilakukan setiap hari yang meliputi pH, kadar TVN dan TMA, total mikroba (TPC) dan perubahan organoleptik.

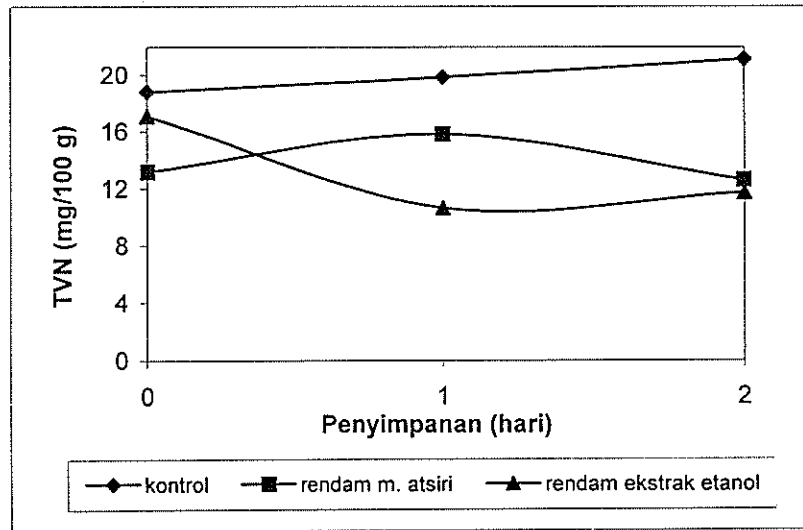


Gambar 14. Perubahan pH fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarsa selama penyimpanan

Nilai pH suatu medium sangat mempengaruhi jasad renik dalam pertumbuhannya. Pada umumnya mikroba memiliki pertumbuhan optimum pada kisaran pH 6.5 sampai 7.5. Pada pH di bawah 5.0 dan di atas 8.5 bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik (Fardiaz, 1992). Ikan yang baru saja dibunuh mempunyai pH netral atau sedikit alkali. Kecenderungan peningkatan nilai pH dapat disebabkan oleh proses autolisis yang menyebabkan penguraian protein menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu menjadi peptida, asam amino dan amonia yang dapat menaikkan pH jaringan ikan.

Nilai pH fillet ikan yang direndam dengan larutan minyak atsiri antarsa 5% (w/v) mengalami sedikit peningkatan selama penyimpanan, namun kenaikan ini masih dalam kisaran pH 6.0 - 7.0 (Gambar 14). Nilai pH untuk kontrol mengalami peningkatan dari awal penyimpanan yang kemudian menurun lagi. Secara umum nilai pH untuk fillet yang direndam minyak atsiri lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini dapat terjadi karena pH larutan minyak atsiri antarsa cukup rendah yaitu sekitar 3.68, dan ini memberi

dugaan bahwa dalam minyak atsiri antarasa terkandung asam-asam organik yang cukup tinggi. Sementara itu pH fillet ikan yang direndam dengan larutan ekstrak etanol 5% (w/v) pada awal penyimpanan sudah mencapai nilai 7.04 dan berfluktuasi selama penyimpanan (Lampiran 11).

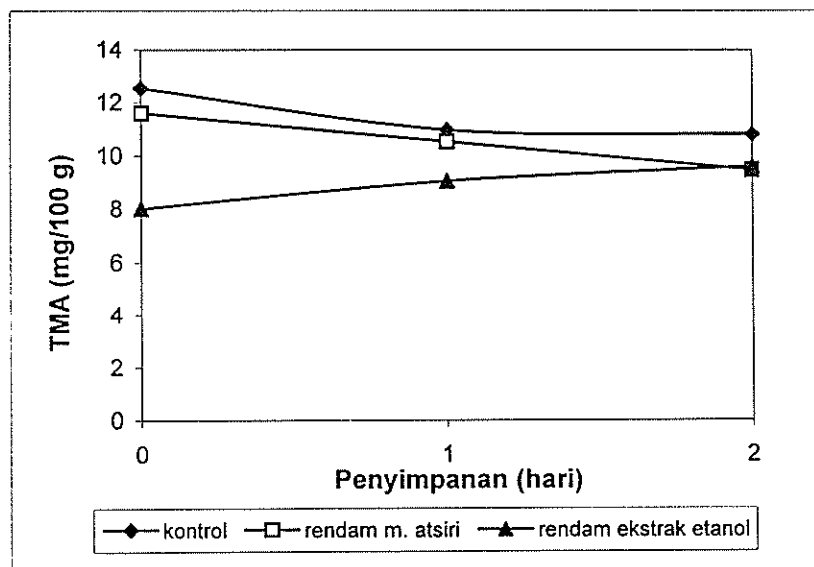


Gambar 15. Perubahan kadar TVN fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan

Pengukuran TVN dimaksudkan untuk mengetahui tingkat kerusakan suatu bahan yang banyak mengandung protein. Pembusukan terjadi karena adanya perombakan protein menjadi asam-asam amino yang menghasilkan  $\text{NH}_3$ . Semakin tinggi tingkat kerusakan bahan, maka TVN juga akan naik. Tetapi karena  $\text{NH}_3$  mudah menguap maka tidak menutup kemungkinan terjadinya penurunan TVN.

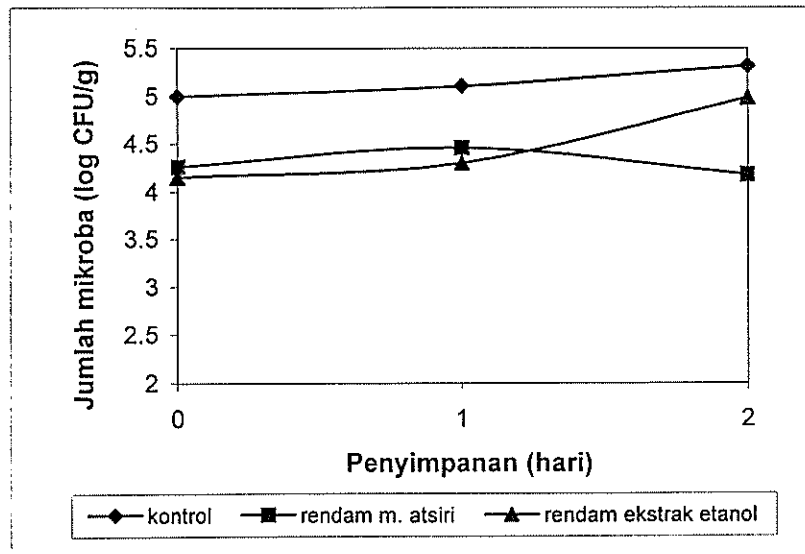
Hasil pengujian kadar TVN (Gambar 15) menunjukkan fillet ikan yang direndam larutan minyak atsiri antarasa, ekstrak etanol maupun kontrol selama penyimpanan masih berada di bawah batas penerimaan yaitu 30 mg/100 g bahan (30 mg persen). Namun demikian perlakuan perendaman mampu menurunkan kadar TVN selama penyimpanan, sedangkan kontrol mengalami peningkatan. Kadar TVN dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 12.

Pada Gambar 16 dapat dilihat kadar TMA untuk kontrol dan perlakuan perendaman dengan minyak atsiri mengalami penurunan selama penyimpanan sedangkan untuk ekstrak etanol mengalami peningkatan. Standar kadar TMA menurut Connel (1980) untuk ikan yang mutunya baik adalah di bawah 15 mg persen dan ini dapat dicapai untuk ketiga perlakuan selama penyimpanan (Lampiran 13). Kadar TMA pada ikan yang diberi perlakuan perendaman menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan kontrol. Peningkatan dan penurunan kadar TMA selama penyimpanan berhubungan dengan aktivitas bakteri yang dapat menguraikan TMAO menjadi TMA.



Gambar 16. Perubahan kadar TMA fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antirasa selama penyimpanan





Gambar 17. Perubahan kandungan total mikroba fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antirasa selama penyimpanan

Kandungan total mikroba pada fillet ikan untuk kontrol pada awal penyimpanan sudah mencapai  $1 \times 10^5$  CFU/g bahan dan meningkat selama penyimpanan walaupun masih di bawah batas penerimaan kesegaran ikan yaitu  $5 \times 10^5$  CFU/g bahan (Gambar 17). Pada kedua perlakuan perendaman kandungan total mikroba dari awal dan selama penyimpanan masih di bawah jumlah  $1 \times 10^5$  CFU/g bahan. Hal ini menunjukkan bahwa perendaman dengan minyak atsiri ataupun ekstrak etanol antirasa cukup efektif untuk mempertahankan kandungan mikroba dalam ikan selama penyimpanan. Jumlah mikroba awal pada kontrol yang masih di bawah batas kesegaran menunjukkan bahwa fillet ikan yang digunakan dalam penelitian masih cukup segar. Hal ini berhubungan dengan tingkat kontaminasi yang dapat dihambat dengan baik selama pembuatan fillet dan transportasi ke laboratorium. Total mikroba selama penyimpanan pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 14.

Hasil pengamatan organoleptik (Lampiran 15) menunjukkan pada kontrol. warna dan aroma mengalami sedikit perubahan pada hari ke-2 penyimpanan, namun tekstur masih sama seperti awal penyimpanan. Jika dibandingkan dengan kontrol perlakuan perendaman menyebabkan perubahan

pada warna, aroma dan tekstur. Warna fillet ikan yang direndam dengan larutan minyak atsiri akan berwarna putih kekuningan sesuai dengan warna minyak atsiri, aroma sedikit amis tetapi aroma ekstrak dominan. Fillet ikan yang direndam dengan larutan ekstrak etanol akan berwarna putih kecoklatan, aroma amis sedikit dan tercium sedikit aroma ekstrak. Selama penyimpanan, warna dan aroma fillet ikan yang direndam ekstrak antarasa tetap sama seperti awal hanya teksturnya menjadi agak lunak. Hal ini dapat terjadi karena adanya penyerapan larutan ekstrak antarasa yang dapat berpengaruh pada jaringan ikat dalam struktur daging ikan sehingga ketegarannya berkurang.

Secara umum kadar TVN, TMA dan kandungan total mikroba selama penyimpanan untuk perlakuan perendaman dengan minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan ekstrak antarasa cukup efektif untuk mempertahankan kesegaran fillet ikan selama dua hari penyimpanan dalam *chiller* ( $-2^{\circ} - 2^{\circ}\text{C}$ ).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Hasil penyulingan dan ekstraksi rempah antarasa menghasilkan minyak atsiri dengan rendemen 3.37% (w/w) berwarna kuning terang dengan aroma lemon. Rendemen ekstrak heksan 3.36% (w/w), warnanya hijau pekat dengan aroma khas antarasa. Ekstrak etanol memiliki rendemen paling tinggi yaitu 7.08% (w/w) dengan warna coklat kehitaman dan aroma khas.

Uji tiosianat menunjukkan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol antarasa pada konsentrasi 200 ppm ternyata mampu melebihi  $\alpha$ -tokoferol walaupun lebih rendah dari BHT dengan periode induksi  $\alpha$ -tokoferol, ekstrak etanol antarasa, dan BHT berturut-turut adalah 1.34, 1.93, dan 3.14 hari. Hal ini berarti bahwa ekstrak etanol antarasa berpotensi sebagai antioksidan alami yang dapat menghambat terjadinya oksidasi asam linoleat yang banyak terkandung dalam bahan pangan.

Hasil pengujian aktivitas antimikroba dengan metode difusi sumur menunjukkan bahwa minyak atsiri antarasa dengan konsentrasi 5% (w/v) memiliki efektivitas dalam menghambat semua bakteri uji (berspektrum luas), sedangkan ekstrak heksan dan ekstrak etanol antarasa hanya mampu menghambat *S.aureus* dan *B.cereus*. Minyak atsiri antarasa efektif menghambat bakteri *S.aureus* sebesar 8.17 mm, *B.cereus* 11.86 mm, *S.Typhimurium* 4.73 mm dan *P.aeruginosa* 0.95 mm.

Ekstrak heksan antarasa mampu menghambat *S.aureus* sebesar 0.53 mm dan *B.cereus* 2.15 mm. Ekstrak etanol antarasa juga mampu menghambat *S.aureus* 11.11 mm dan *B.cereus* 10.53 mm. Dari penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) diperoleh nilai MIC untuk ekstrak minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa terhadap *S.aureus* adalah 0.5 mg/ml (0.05% w/v), sedangkan nilai MIC untuk minyak atsiri antarasa terhadap *B.cereus* 3 mg/ml (0.3% w/v), ekstrak etanol 0.5 mg/ml. Nilai MIC minyak atsiri antarasa terhadap *S.Typhimurium* adalah 3 mg/ml.

Aplikasi ekstrak antarasa (minyak atsiri dan ekstrak etanol) pada fillet (daging dengan kulit) ikan kakap merah secara umum menunjukkan kadar

TVN, TMA dan kandungan total mikroba selama penyimpanan dua hari dalam *chiller* ( $-2^{\circ} - 2^{\circ}\text{C}$ ) lebih baik dari kontrol. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak antarasa cukup efektif untuk dijadikan sebagai salah satu pengawet alami pada bahan pangan berkaitan dengan aktivitas antimikrobanya, sehingga dapat menggantikan penggunaan pengawet sintetik yang keamanannya masih diragukan. Hasil penelitian ini juga dapat mendorong peningkatan nilai ekonomi tanaman antarasa dan pembudidayaannya, sehingga dapat mencegah kepunahannya.

## B. SARAN

Minyak atsiri dan ekstrak etanol antarasa terbukti efektif mempertahankan kesegaran fillet ikan kakap merah selama penyimpanan. Oleh karena itu aplikasi lebih lanjut di lapangan perlu dilakukan, terutama untuk membantu nelayan agar ikan dari laut tetap terjaga kesegarannya ketika sampai di darat. Faktor penerimaan konsumen terhadap karakteristik bahan pangan setelah ditambahkan ekstrak (organoleptik) juga perlu dipertimbangkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M.R. dan M.O. Moss. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16<sup>th</sup> ed. AOAC International, Arlington, Virginia.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, S. Yasni, S. Budiyanto. 1989. Analisis Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Ardiansyah. 2001. Teknik Ekstraksi Komponen Antimikroba Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodicum*) dan Antarasa (*Litsea cubeba*). Skripsi. FATETA, IPB, Bogor.
- Bombardelli, E. 1991. Technologies for The Processing of Medicinal Plants. *Di dalam* R.O.B. Wijesekera (ed.). The Medicinal Plant Industry. CRC Press, Boca Raton.
- Chen, H.M., K. Muramoto, dan F. Yamauchi. 1995. Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean  $\beta$ -Conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 574-578.
- Connel, J.J. 1980. Control of Fish Quality, 2<sup>nd</sup> ed. Fishing News Book Ltd., Farnham, Surrey, England.
- Cuppett, S., M. Schnepf dan C. Hall III. 1997. Natural Antioxidants - Are They Reality?. *Di dalam* Shahidi, F. (ed.). Natural Antioxidants. Hal. 12-24. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Depkes. 1986. Tanaman Obat Indonesia. Jilid I. Depkes RI, Jakarta.
- Ditjen Perikanan. 1990. Pedoman Pengenalan Sumber Perikanan Laut. Direktorat Jenderal Perikanan, Jakarta. 164 hal.
- Eskin, N.A.M. 1990. Biochemistry of Food. Academic Press, New York.
- Farag, R.S., Z.Y. Daw, F.M. Hewedi dan G.S.A. El-Baroty. 1989. Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spices Essential Oils. *J. Food Protec.* 52 (9) : 665.
- Fardiaz, S. 1989. Analisis Mikrobiologi Pangan. Petunjuk Laboratorium. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- \_\_\_\_\_. 1992. Mikrobiologi Pangan. PT Gramedia, Jakarta.

- Farrell, K.T. 1990. Spices, Condiments and Seasonings. The AVI Publ. Co. Inc., Westport, Connecticut.
- Garriga, M., M. Hugas, T. Aymerich, dan J.M. Monfort. 1993. Bacteriocinogenic Activity of Lactobacilli from Fermenter Sausages. *J. Appl. Bact.* 75 : 142-148.
- Gill, T. 1992. Biochemical and Indicators of Seafood Quality. *Di dalam* H.H. Huss, M. Jacobsen, dan J. Liston (eds.). *Quality Assurance in Fish Industry*. Elsevier, Amsterdam.
- Hasairin, A. 1994. Etnobotani Rempah dalam Makanan Adat Masyarakat Batak Angkola dan Mandailing. Tesis. Program Pasca Sarjana, IPB, Bogor.
- Hatano, T., H. Kagawa, T.T. Yasuhara, dan I. Okuda. 1988. Two New Flavonoids and Other Constituents in Licorice Roots : Their Relative Astringency and Radical Scavenging Effect. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2090-2097.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid II. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan RI, Jakarta.
- Houghton, P.J. dan A. Raman. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extract*. Chapman and Hall, London.
- Jay, S.J. 1996. *Modern Food Microbiology*. 5<sup>th</sup> ed. Chapman and Hall, New York.
- Karyadi, E. 1997. Antioksidan, Resep Sehat dan Umur Panjang. <http://www.indonesia.com/intisari/1997/juni/antioks.htm>. [20 Januari 2004]
- Kochhar, S.P. dan J.B. Rossell. 1990. Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food Systems. *Di dalam* Hudson B.J.F. (ed.). *Food Antioxidants*. Hal. 19-64. Elsevier Applied Science, New York.
- Lay, B.W. dan S. Hastowo. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Press, Jakarta.
- Loliger, J. 1983. Natural Antioxidants. *Di dalam* Allen, J.C. dan R.J. Hamilton (eds.). *Rancidity in Foods*. Hal. 89-108. Applied Science Publishers, London.
- Marumata, U.M. 2001. Uji Performansi Model Awal Alat Elektronika Sebagai Detektor Kemunduran Mutu Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sp.*) Berdasarkan Tahanan Listriknya. Skripsi. Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, IPB, Bogor.
- Mulia, L. 2000. Kajian Aktivitas Antimikroba Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodicum*) dan Antarasa (*Litsea cubeba*). Skripsi. FATETA, IPB, Bogor.

- Mulyono, A.H. 2003. Aplikasi Rempah Mobe (*Ficus sp.*) dan Antarasa (*Litsea cubeba*) sebagai Bahan Pengawet Alami pada Fillet Ikan Kakap Merah (*Lutjanus erythropterus*). Skripsi. FATETA, IPB, Bogor.
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, dan N.R. Krieg. 1993. Microbiology Concepts and Application. Mc Graw Hill Book Co., New York.
- Portillo, F.G.D. 2000. Molecular and Cellular Biology of *Salmonella* Pathogenesis. Di dalam Cary, J.W., J.E. Linz, dan D. Bhatnagar (eds.). Microbial Foodborne Disease. Technomic publishing Co., Pennsylvania.
- Prasetyawati, R.C. 2003. Evaluasi Daya Antioksidatif Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale*) terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Hati Tikus yang Mengalami Perlakuan Stres. Skripsi. FATETA, IPB, Bogor.
- Pratt, D.E. dan B.J.F. Hudson. 1990. Natural Antioxidants Not Exploited Commercially. Di dalam Hudson, B.J.F. (ed.). Food Antioxidant. Hal 171-192. Elsevier Applied Science, New York.
- Russel, A.D. 1990. Bacterial Spores and Chemical Sporocidal Agents. Microbiol. Rev. 3 : 99.
- Sherwin, E.R. 1990. Antioxidants. Di dalam Branen, A.L., P.M. Davidson dan S. Salminen (eds). Food Additives. Hal. 139-194. Marcel Dekker, New York.
- Sikkema, J.J., A. de Bont, dan B. Poolman. 1995. Mechanism of Membran Toxicity of Hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59 : 70.
- White, P.J. 1995. Conjugated Diene, Anisidine Value and Carbonyl Value Analysis. Di dalam K.Warner dan N.A.M. Eskin (ed.). Methods to Asseses Quality and Stability of Oils and Fat Containing Foods. AOAC Press, Champaign.
- Widiastuti, B. 2000. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodicum* DC.) dan Pengaruhnya Terhadap Produksi Radikal Bebas Makrofag Mencit. Skripsi. FATETA, IPB, Bogor.
- Winarno, F.G. 1995. Kimia Pangan dan Gizi. PT Gramedia, Jakarta.
- Yasni, S. 2001. Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodicum*) dan Antarasa (*Litsea cubeba*) terhadap Bakteri dan Kapang serta Profil Deskriptif Komponen Aktif Penyusunnya. Di dalam Nuraida, L. dan R.Dewanti-Hariyadi (eds.). Pangan Tradisional: Basis Bagi Industri Pangan Fungsional dan Suplemen. Hal. 130-138. Pusat Kajian Makanan Tradisional, IPB, Bogor.
- Yen, G.C. dan H.Y. Chen. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. 43, 27-32.

LAMPYRAN



Lampiran 1. Data pengukuran absorbansi dan nilai regresi linier masing-masing sampel dengan metode tiosianat

Sampel	Nilai absorbansi hari ke-					Regresi linier
	0	1	2	3	4	
Kontrol*	0.320	0.889	1.080	>2.000	>2.000	$y = 0.38 x + 0.383$
	0.332	0.982	1.176	>2.000	>2.000	$y = 0.422 x + 0.408$
	<b>0.326</b>	<b>0.936</b>	<b>1.128</b>	<b>&gt;2.000</b>	<b>&gt;2.000</b>	<b><math>y = 0.401 x + 0.3957</math></b>
BHT	0.220	0.250	0.254	0.293	0.290	$y = 0.0183 x + 0.2248$
	0.269	0.279	0.326	0.298	0.332	$y = 0.0145 x + 0.2718$
	<b>0.245</b>	<b>0.265</b>	<b>0.290</b>	<b>0.296</b>	<b>0.311</b>	<b><math>y = 0.0163 x + 0.2488</math></b>
$\alpha$ - tokoferol	0.145	0.230	0.313	0.461	0.645	$y = 0.1231 x + 0.1126$
	0.152	0.271	0.400	0.485	0.803	$y = 0.1516 x + 0.119$
	<b>0.149</b>	<b>0.251</b>	<b>0.357</b>	<b>0.473</b>	<b>0.724</b>	<b><math>y = 0.1372 x + 0.1164</math></b>
Minyak atsiri**	0.265	0.648	0.988	1.148	>2.000	$y = 0.2989 x + 0.3139$
	0.377	0.680	1.040	1.250	>2.000	$y = 0.2979 x + 0.3899$
	<b>0.321</b>	<b>0.664</b>	<b>1.014</b>	<b>1.199</b>	<b>&gt;2.000</b>	<b><math>y = 0.2984 x + 0.3519</math></b>
Ekstrak heksan antarasa	0.369	0.403	0.431	0.464	0.532	$y = 0.0387 x + 0.3624$
	0.393	0.430	0.444	0.484	0.558	$y = 0.0384 x + 0.385$
	<b>0.381</b>	<b>0.417</b>	<b>0.438</b>	<b>0.474</b>	<b>0.545</b>	<b><math>y = 0.0385 x + 0.374</math></b>
Ekstrak etanol antarasa	0.238	0.223	0.274	0.301	0.398	$y = 0.0398 x + 0.2072$
	0.239	0.308	0.282	0.324	0.440	$y = 0.0418 x + 0.235$
	<b>0.239</b>	<b>0.266</b>	<b>0.278</b>	<b>0.313</b>	<b>0.419</b>	<b><math>y = 0.0407 x + 0.2216</math></b>

\* Perhitungan regresi linier sampai hari ke-2

\*\*Perhitungan regresi linier sampai hari ke-3

Lampiran 2. Nilai periode induksi masing-masing sampel

Sampel	Periode induksi (hari)
Kontrol	-0.22
	-0.26
	<b>-0.24</b>
BHT	4.11
	1.94
	<b>3.14</b>
$\alpha$ -tokoferol	1.52
	1.19
	<b>1.34</b>
Minyak atsiri	-0.05
	-0.30
	<b>-0.17</b>
Ekstrak heksan antarasa	-1.61
	-2.21
	<b>-1.92</b>
Ekstrak etanol antarasa	2.33
	1.56
	<b>1.93</b>

Contoh perhitungan periode induksi ( BHT ) :

$$y = 0.0163 x + 0.2488$$

$$0.3 = 0.0163 x + 0.2488$$

$$x = 3.14 \text{ hari}$$

Keterangan : 0.3 adalah nilai absorbansi yang menunjukkan batas jumlah peroksida pada pengukuran aktivitas antioksidan metode tiosianat.

Lampiran 3. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-0

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	Inhibisi (%)	Persamaan	IC <sub>50</sub> =x
BHT	10	1.156	1.112	$y = 30.888 \text{ Ln}(x) - 59.515$	34.658
	50	0.221	81.095		
	100	0.134	88.537		
	200	0.128	89.050		
α-tokoferol	10	1.088	6.929	$y = 29.742 \text{ Ln}(x) - 54.705$	34.124
	50	0.328	71.942		
	100	0.102	91.275		
	200	0.112	90.419		
Minyak atsiri 1	10	1.156	1.112	-	Tidak Aktif
	50	1.138	2.652		
	100	1.152	1.454		
	200	1.160	0.770		
Minyak atsiri 2	10	1.151	1.540	-	Tidak Aktif
	50	1.239	-5.988		
	100	1.144	2.139		
	200	1.206	-3.165		
Ekstrak etanol 1	10	1.131	3.251	$y = 0.0853 x - 3.2705$	624.508
	50	1.231	-5.304		
	100	1.123	3.935		
	200	0.985	15.740		
Ekstrak etanol 2	10	1.177	-0.684	-	Tidak Aktif
	50	1.113	4.790		
	100	1.173	-0.342		

Keterangan : Absorbansi blanko pada jam ke-0 = 1.169

Persamaan garis tidak harus persamaan linier, tergantung nilai R<sup>2</sup>.

Contoh perhitungan (BHT) :

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi} &= \frac{\text{Abs. blanko} - A}{\text{Abs. blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{1.169 - 1.156}{1.169} \times 100\% = 1.112\% \end{aligned}$$

$$\text{Persamaan : } y = 30.888 \ln(x) - 59.515$$

$$50^*) = 30.888 \ln(x) - 59.515$$

$$x = 34.658 \text{ ppm}$$

\*) 50 adalah penghambatan sebesar 50% oleh sampel antioksidan

Lampiran 4. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-1

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	Inhibisi (%)	Persamaan	IC <sub>50</sub> = x
BHT	10	1.144	0.694	$y = 31.146 \ln(x) - 58.469$	32.557
	50	0.139	87.934		
	100	0.114	90.104		
	200	0.122	89.410		
α-tokoferol	10	1.104	4.167	$y = 30.862 \ln(x) - 59.322$	34.536
	50	0.307	73.351		
	100	0.096	91.667		
	200	0.104	90.972		
Minyak atsiri 1	10	1.114	3.299	-	Tidak Aktif
	50	1.127	2.170		
	100	1.139	1.128		
	200	1.129	1.997		
Minyak atsiri 2	10	1.147	0.434	-	Tidak Aktif
	50	1.141	0.955		
	100	1.124	2.431		
	200	1.140	0.521		
Ekstrak etanol 1	10	1.186	-2.951	$y = 0.1239 x - 7.3997$	463.274
	50	1.181	-2.517		
	100	1.142	0.868		
	200	0.926	19.618		
Ekstrak etanol 2	10	1.206	-4.688	$y = 0.0656 x - 5.3506$	843.759
	50	1.176	-2.083		
	100	1.138	1.215		

Keterangan : Abs. blanko pada jam ke-1 = 1.152

Lampiran 5. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-2

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	Inhibisi (%)	Persamaan	IC <sub>50</sub> = x
BHT	10	1.172	-0.601	$y = 30.955 \text{ Ln}(x) - 59.217$	34.066
	50	0.156	86.609		
	100	0.133	88.584		
	200	0.146	87.468		
$\alpha$ -tokoferol	10	1.067	8.412	$y = 28.671 \text{ Ln}(x) - 51.067$	33.954
	50	0.339	70.901		
	100	0.121	89.614		
	200	0.129	88.927		
Minyak atsiri 1	10	1.167	-0.172	-	Tidak Aktif
	50	1.203	-3.262		
	100	1.177	-1.030		
	200	1.159	0.515		
Minyak atsiri 2	Tidak dihitung				
Ekstrak etanol 1	10	1.198	-2.833	-	Tidak Aktif
	50	1.152	1.116		
	100	1.161	0.343		
	200	0.880	24.464		
Ekstrak etanol 2	10	1.185	-1.717	$y = 0.0738 x - 2.6203$	713.012
	50	1.156	0.773		
	100	1.108	4.893		

Keterangan : Abs. blanko pada jam ke-2 = 1.165

Lampiran 6. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-3

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	Inhibisi (%)	Persamaan	IC <sub>50</sub> = x
BHT	10	1.202	2.986	$y = 30.497 \ln(x) - 54.849$	31.125
	50	0.139	88.781		
	100	0.118	90.476		
	200	0.125	89.911		
$\alpha$ -tokoferol	10	1.058	14.609	$y = 26.763 \ln(x) - 40.12$	29.518
	50	0.333	73.123		
	100	0.105	91.525		
	200	0.116	90.638		
Minyak atsiri 1	10	1.194	3.632	-	Tidak Aktif
	50	1.172	5.408		
	100	1.183	4.520		
	200	1.221	1.453		
Minyak atsiri 2	Tidak dihitung				
Ekstrak etanol 1	10	1.250	-0.888	$y = 0.166 x - 4.6306$	329.1
	50	1.158	6.538		
	100	1.193	3.713		
	200	0.844	31.881		
Ekstrak etanol 2	10	1.210	2.341	$y = 0.0994 x + 0.9927$	493.031
	50	1.173	5.327		
	100	1.100	11.219		

Keterangan : Abs. blanko pada jam ke-3 = 1.239

Lampiran 7. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-4

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	Inhibisi (%)	Persamaan	IC <sub>50</sub> = x
BHT	10	1.121	6.427	$y = 28.798 \ln(x) - 47.99$	30.054
	50	0.145	87.896		
	100	0.125	89.566		
	200	0.140	88.314		
α-tokoferol	10	0.988	17.529	$y = 25.744 \ln(x) - 36.459$	28.732
	50	0.342	71.452		
	100	0.113	90.568		
	200	0.125	89.566		
Minyak atsiri 1	10	1.171	2.254	-	Tidak Aktif
	50	1.184	1.169		
	100	1.161	3.088		
	200	1.147	4.257		
Minyak atsiri 2	Tidak dihitung				
Ekstrak etanol 1	10	1.149	4.090	$y = 0.1547 x - 1.7165$	334.302
	50	1.124	6.177		
	100	1.133	5.426		
	200	0.801	33.39		
Ekstrak etanol 2	10	1.173	2.087	$y = 0.1134 x + 0.8542$	433.384
	50	1.122	6.344		
	100	1.051	12.270		

Keterangan : Abs. blanko pada jam ke-4 = 1.198

Lampiran 8. Data aktivitas antioksidan masing-masing sampel dengan metode DPPH pada jam ke-5

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	Inhibisi (%)	Persamaan	IC <sub>50</sub> = x
BHT	10	1.085	4.489	$y = 29.107 \text{ Ln}(x) - 50.651$	31.753
	50	0.156	86.268		
	100	0.129	88.644		
	200	0.146	87.148		
α-tokoferol	10	0.898	20.951	$y = 24.269 \text{ Ln}(x) - 30.607$	27.688
	50	0.347	69.454		
	100	0.118	89.613		
	200	0.128	88.732		
Minyak atsiri 1	10	1.120	1.408	-	Tidak Aktif
	50	1.149	-1.144		
	100	1.148	-1.056		
	200	1.122	1.232		
Minyak atsiri 2	Tidak dihitung				
Ekstrak etanol 1	Tidak dihitung				
Ekstrak etanol 2	Tidak dihitung				

Keterangan : Abs. blanko pada jam ke-5 = 1.136

Lampiran 9. Aktivitas antimikroba ekstrak antarasa terhadap bakteri uji

No	Bakteri	Jenis ekstrak	Aktivitas antimikroba 5% (w/v)			Amoxicillin 0.05% (w/v)	
			mm	mm/g ekstrak	mm/g bahan	mm	mm/g ekstrak
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Minyak atsiri	8.17	2723.33	91.67	12.12	404 000
		Ekstrak Heksan	0.53	176.67	3.13	10.31	343 666.6
		Ekstrak Etanol	11.11	3703.33	135.51	11.03	367 666.6
2.	<i>Bacillus cereus</i>	Minyak atsiri	11.86	3953.33	133.08	8.45	281 666.6
		Ekstrak Heksan	2.15	716.67	12.71	6.36	212 000
		Ekstrak Etanol	10.53	3510.00	128.43	6.61	220 333.2
3.	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Minyak atsiri	4.73	1576.67	53.07	19.29	643 000
		Ekstrak Heksan	0	0	0	20.58	686 000
		Ekstrak Etanol	0	0	0	21.05	701 666.6
4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Minyak atsiri	0.95	316.67	10.66	5.83	194 333.2
		Ekstrak Heksan	0	0	0	5.93	197 666.6
		Ekstrak Etanol	0	0	0	6.23	207 666.6

Catatan : Ekstrak yang diuji = 60 µl

Contoh perhitungan (*S. aureus*, ekstrak etanol) :

Aktivitas antimikroba (mm/gram ekstrak) =

$$\frac{\text{diameter (mm)}}{\text{volume ekstrak uji (\mu l)}} \times \frac{\text{volume ekstrak (\mu l)}}{\text{berat ekstrak (g)}}$$

$$\text{Aktivitas antimikroba (mm/gram ekstrak)} = \frac{11.11 \text{ mm}}{60 \mu\text{l}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.05 \text{ gram}} = 3703.33 \text{ mm/gram ekstrak}$$



Aktivitas antimikroba (mm/gram bahan) =

$$\frac{\text{diameter (mm)}}{\text{volume ekstrak uji } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{volume ekstrak } (\mu\text{l})}{\text{berat ekstrak (g)}} \times \frac{\text{berat total ekstrak (g)}}{\text{berat bahan (g)}}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas antimikroba (mm/gram bahan)} &= \frac{11.11 \text{ mm}}{60 \mu\text{l}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.05 \text{ gram}} \times \frac{22.62 \text{ gram}}{618.20 \text{ gram}} \\ &= 135.51 \text{ mm/gram bahan} \end{aligned}$$

Lampiran 10. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak antarasa terhadap bakteri uji

No.	Bakteri	Nilai MIC (mg/ml)	
		Minyak atsiri	Ekstrak etanol
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5	0.5
2.	<i>Bacillus cereus</i>	3.0	0.5
3.	<i>Salmonella Typhimurium</i>	3.0	-
4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-

Keterangan : (-) tidak dilakukan

Lampiran 11. Perubahan pH fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan

Penyimpanan	Kontrol	Rendam minyak atsiri 1 jam	Rendam ekstrak etanol 1 jam
0 hari	6.35	6.10	7.04
1 hari	6.55	6.24	6.69
2 hari	6.39	6.30	6.78

Lampiran 12. Perubahan kadar TVN fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan

Penyimpanan	Kontrol (mg/100 g)	Rendam minyak atsiri 1 jam (mg/100 g)	Rendam ekstrak etanol 1 jam (mg/100 g)
0 hari	18.83	13.19	17.10
1 hari	19.87	15.81	10.65
2 hari	21.16	12.62	11.73

Lampiran 13. Perubahan kadar TMA fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan

Penyimpanan	Kontrol (mg/100 g)	Rendam minyak atsiri 1 jam (mg/100 g)	Rendam ekstrak etanol 1 jam (mg/100 g)
0 hari	12.55	11.61	8.02
1 hari	10.98	10.54	9.06
2 hari	10.82	9.47	9.60

Lampiran 14. Perubahan kandungan total mikroba fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan

Penyimpanan	Kontrol (CFU/g bahan)	Rendam minyak atsiri 1 jam (CFU/g bahan)	Rendam ekstrak etanol 1 jam (CFU/g bahan)
0 hari	$1 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$
1 hari	$1.3 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$
2 hari	$2.1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$

Lampiran 15. Perubahan organoleptik fillet ikan yang direndam dalam larutan ekstrak antarasa selama penyimpanan

Penyimpanan	Perlakuan	Parameter		
		Warna	Aroma (bau)	Tekstur
0 hari	Kontrol	Putih transparan	Amis ikan segar	Kenyal, tegar
	Rendam minyak atsiri 1 jam	Putih kekuningan	Amis sedikit, bau ekstrak dominan	Kenyal, tegar
	Rendam ekstrak etanol 1 jam	Putih kecoklatan	Amis sedikit, bau ekstrak sedikit	Kenyal, tegar
1 hari	Kontrol	Putih transparan	Amis ikan segar	Kenyal, tegar
	Rendam minyak atsiri 1 jam	Putih kekuningan	Amis sedikit, bau ekstrak dominan	Agak lunak
	Rendam ekstrak etanol 1 jam	Putih kecoklatan	Amis sedikit, bau ekstrak sedikit	Agak lunak
2 hari	Kontrol	Putih agak pucat	Bau amis bertambah	Kenyal, tegar
	Rendam minyak atsiri 1 jam	Putih kekuningan	Amis sedikit, bau ekstrak dominan	Agak lunak
	Rendam ekstrak etanol 1 jam	Putih kecoklatan	Amis sedikit, bau ekstrak sedikit	Agak lunak