

F/TPG  
2004  
047

1/5

**MEMPELAJARI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI  
DARI EKSTRAK CAMPURAN REMPAH MINUMAN *CINNA-ALE***

Oleh :  
**EVITA DAMAYANTI**  
**F02499132**



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

**Evita Damayanti. F02499132.** Mempelajari Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri dari Ekstrak Campuran Rempah Minuman *Cinna-Ale*. Di bawah bimbingan Sedarnawati Yasni. 2004.

---

## RINGKASAN

*Cinna-Ale* adalah minuman kesehatan yang terbuat dari rempah-rempah asli Indonesia dengan karakteristik berwarna merah, beraroma dan rasa yang khas. Nama *Cinna-Ale* diambil dari nama latin kayu manis (*Cinnamomum burmanii* Blume) dan jahe (*Zingiber officinale* Roscoe), yang merupakan komponen utama pembentuk citarasa minuman. Minuman *Cinna-Ale* terbuat dari 17 jenis rempah-rempah dengan komposisi formula sesuai paten No. P002001 00054.

Penelitian ini terbagi menjadi tiga tahapan, yaitu ekstraksi campuran rempah penyusun minuman, pengukuran aktivitas antioksidan dan pengujian antibakteri rempah. Tahap ekstraksi rempah menghasilkan tiga ekstrak, yaitu minyak atsiri, ekstrak heksan dan ekstrak etanol. Minyak atsiri diperoleh dengan metode Distilasi Uap, kemudian dilakukan ekstraksi bertingkat metode Refluks ( $60^{\circ}\text{C}$ , 3 jam) menggunakan pelarut organik heksan dan etanol. Rendemen ekstrak minyak atsiri sebesar 1.56 % (w/w), ekstrak heksan 1.39 % (w/w), dan ekstrak etanol 8.81 % (w/w). Masing-masing ekstrak diukur aktivitas antioksidannya dengan menggunakan metode Tiosianat dan DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazil). Pada metode Tiosianat digunakan standar BHT dan  $\alpha$ -tokoferol, dan diukur pada panjang gelombang 500 nm. Hasil pengukuran dinyatakan dengan periode induksi. Periode induksi tertinggi dicapai oleh BHT yaitu 3.14 hari, sedangkan dengan pembanding lainnya yaitu  $\alpha$ -tokoferol hanya memiliki periode induksi sebesar 1.34 hari. Minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki periode induksi yang tidak jauh berbeda dengan pembanding  $\alpha$ -tokoferol (1.31 hari). Ekstrak etanol memiliki periode induksi paling rendah (1.12 hari), sedangkan ekstrak heksan memiliki periode induksi yang bernilai negatif. Hal ini memberikan kesimpulan bahwa aktivitas antioksidan minyak atsiri *Cinna-Ale* tidak jauh berbeda dengan antioksidan komersial  $\alpha$ -tokoferol. Minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki peluang untuk dijadikan sumber antioksidan alami.

Pengukuran aktivitas antioksidan selain dilakukan dengan metode Tiosianat juga dilakukan dengan metode *Scavenging Effect on DPPH Radical* (efek peredaman terhadap radikal bebas DPPH). Ekstrak rempah yang diuji hanya minyak atsiri dan ekstrak etanol. Pengujian dilakukan pada panjang gelombang 515 nm dan hasilnya dinyatakan dengan bilangan  $\text{IC}_{50}$ . Minyak atsiri memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 58.161  $\mu\text{g/ml}$  pada pengukuran jam ke-0 dan semakin menurun selama 4 jam pengukuran berikutnya menjadi 42.547  $\mu\text{g/ml}$ . Begitu pula dengan ekstrak etanol memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  yang semakin menurun yaitu 174.505  $\mu\text{g/ml}$  pada pengukuran jam ke-0 menjadi 126.900  $\mu\text{g/ml}$  pada pengukuran jam ke-4. Semakin kecil nilai  $\text{IC}_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Minyak atsiri termasuk dalam senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat ( $\text{IC}_{50}$  kurang dari 50), sedangkan ekstrak etanol termasuk senyawa dengan aktivitas antioksidan sedang ( $\text{IC}_{50} = 100 - 150$ ). Hasil ini memperkuat

kesimpulan bahwa minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki peluang untuk dijadikan sumber antioksidan alami.

Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Difusi Sumur menggunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negatif). Ekstrak rempah uji pada konsentrasi 4 % (w/v) dibandingkan dengan kontrol positif *amoxycillin* dengan konsentrasi 0.05 % (w/v). Minyak atsiri memberikan daya hambat terhadap *S. aureus* sebesar 4.77 mm, *E. coli* 3.34 mm, dan *S. Typhimurium* 5.37 mm. Ekstrak heksan tidak memberikan penghambatan terhadap semua bakteri uji. Ekstrak etanol hanya menghambat *P. aeruginosa* dengan diameter penghambatan 1.08 mm. Pengujian antibakteri dilanjutkan dengan penentuan konsentrasi minimum penghambatan (MIC) ekstrak. MIC adalah konsentrasi terendah dari komponen antibakteri, yang pada kondisi tersebut tidak terjadi pertumbuhan bakteri selama masa inkubasi 24 jam. Pengujian dilakukan dengan kisaran konsentrasi ekstrak 0, 5, 10, 15, 20 dan 25 mg/ml. Setelah diperoleh konsentrasi minimum penghambatan ekstrak kemudian pengujian dilanjutkan dengan mempersempit selang konsentrasi menjadi 0.5 mg/ml. Minyak atsiri memiliki nilai MIC 2 mg/ml (0.2 % w/v) untuk bakteri Gram negatif *S. Typhimurium*, dan 0.5 mg/ml (0.05 % w/v) untuk bakteri Gram positif *S. aureus*.

**MEMPELAJARI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI  
DARI EKSTRAK CAMPURAN REMPAH MINUMAN *CINNA-ALE***

**Oleh :  
EVITA DAMAYANTI  
F02499132**

**SKRIPSI  
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN  
Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor**

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

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

---

**MEMPELAJARI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI  
DARI EKSTRAK CAMPURAN REMPAH MINUMAN *CINNA-ALE***

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN  
Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor**

**Oleh :**

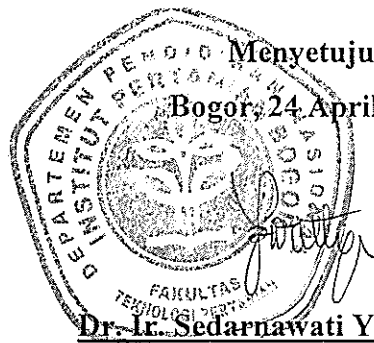
**Evita Damayanti**

**F02499132**

**Dilahirkan di Kuningan, 02 Oktober 1982**

**Tanggal Lulus : 24 Maret 2004**

**Menyetujui,  
Bogor, 24 April 2004**



**Dr. Ir. Sedarnawati Yasni, M.Agr.**

**Dosen Pembimbing**

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT untuk segala kemudahan dan kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan seluruh rangkaian penelitian dan penulisan skripsi ini. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu selama penyelesaian tugas ini, antara lain :

1. Dr. Ir. Hj. Sedarnawati Yasni, M.Agr selaku dosen pembimbing akademik yang telah banyak memberikan bimbingan dan masukan selama masa studi di TPG dan penyelesaian tugas akhir.
2. Dr. Ir. Yadi Haryadi, MSc dan Ir. Didah Nur Faridah, Msi selaku dosen penguji yang telah memberikan saran perbaikan guna menyempurnakan skripsi ini.
3. Ibunda dan Ayahanda tercinta untuk setiap tetes kasih sayang dan doa yang senantiasa tercurah dan takkan pernah tergantikan. *Thanks* juga buat adikku Erika atas semangat, keceriaan dan pinjaman komputernya.
4. Keluarga besar Villa Kampung Rawa Selatan III. Makasih untuk rumah yang nyaman, rasa kekeluargaan dan makanan lezat. Kalian seperti keluarga kedua untukku.
5. Teman satu bimbingan Dewi Rahmawati (Idew) dan Dian Wahyuningsih (DW) untuk kebersamaan dalam suka dan duka penelitian terutama saat penelitian mencapai titik jenuh.
6. The D-ers : Ndari (teman dari awal sampai akhir), Ate, Destwiw, Meir, Itinx, Kiki, Della NZ, Ajeng, BQ, Mimi, Ivonne, Ikha, Dee, Nani, Roni dan lainnya. *Without you guys my last four years will be colourless!*
7. Para Laboran yang telah banyak membantu : Pak Sobirin, Pak Wachid, Pak Rojak, Pak Koko, Pak Sidik, Teh Ida, Mba Yane dan Mba Ririn.
8. *Special thanks to* : keluarga besar Micro-babe (Anne, Echi, Intan, Ikha, Dery dan Nani) makasih buat ilmu mikro-nya yang singkat, padat dan jelas.
9. Keluarga Besar Wisma QQ : Ova "ceniel", Diana "penasehat spiritual", my roommate Fifit, "The Giant Sis" (Titien, Rita dan Josi) juga adik-adik lainnya. Kebersamaan yang tak mungkin terlupakan.

10. Teman-teman yang jauh di mata dekat di hati : Asep Wawan, Sarah, Indah, Aldi dan Zul. Makasih untuk doa, semangat dan sms-sms yang penuh perhatian.
11. Subagio Effendi untuk doa, semangat, kesabaran dan rasa sayang yang semoga tercurah dari ketulusan hati. *Never thought still have you in that hard moment.*

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karenanya penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak. Semoga tulisan ini dapat membantu bagi yang memerlukannya.

Bogor, April 2004

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
I. PENDAHULUAN .....	1
A. LATAR BELAKANG .....	1
B. TUJUAN .....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
A. CINNA – ALE.....	3
B. TEKNIK EKSTRAKSI REMPAH-REMPAH .....	4
C. ANTIOKSIDAN DAN MEKANISME ANTIOKSIDASI .....	5
D. METODE PENGUKURAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN.....	6
1. Metode Sistem Model $\beta$ -karoten/Linoleat .....	7
2. Metode Diene Terkonjugasi .....	7
3. Metode Rancimat .....	8
4. Metode Tiosianat .....	8
5. Metode <i>Scavenging Effect on DPPH Radical</i> .....	9
E. REMPAH-REMPAH SEBAGAI ANTIOKSIDAN ALAMI .....	9
F. REMPAH-REMPAH SEBAGAI ANTIMIKROBA .....	10
G. KARAKTERISASI BAKTERI PATOGEN DAN PERUSAK MAKANAN .....	11
1. <i>Escherichia coli</i> .....	11
2. <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	12
3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	15
A. BAHAN DAN ALAT .....	15
B. METODE PENELITIAN.....	15



1. Persiapan Ekstrak <i>Cinna-Ale</i> .....	16
2. Pengujian Aktivitas Antioksidan Secara Kimia dengan Metode Tiosianat .....	18
3. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) .....	18
4. Pengujian Aktivitas Antibakteri Menggunakan Uji Difusi Sumur .....	19
5. Penentuan MIC ( <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ) pada Agar Cawan .....	20
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	22
A. PERSIAPAN EKSTRAK REMPAH <i>CINNA-ALE</i> .....	22
B. PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE TIOSIANAT.....	23
C. PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE DPPH.....	27
D. AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK REMPAH <i>CINNA-ALE</i> .....	29
1. Minyak Atsiri .....	31
2. Ekstrak Heksan .....	33
3. Ekstrak Etanol .....	34
E. KONSENTRASI MINIMUM PENGHAMBATAN (MIC) .....	35
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
A. KESIMPULAN.....	37
B. SARAN.....	38
DAFTAR PUSTAKA .....	40
LAMPIRAN.....	43

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rendemen ekstrak rempah <i>Cinna-Ale</i> .....	23
Tabel 2. Nilai IC <sub>50</sub> sampel ekstrak pada tiap jam uji .....	28
Tabel 3. Aktivitas antibakteri ekstrak rempah <i>Cinna-Ale</i> .....	30

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida .....	6
Gambar 2. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi .....	6
Gambar 3. Alur tahapan penelitian .....	16
Gambar 4. Diagram alir ekstraksi metode refluks .....	17
Gambar 5. Diagram alir uji aktivitas antioksidan metode DPPH .....	19
Gambar 6. Kurva kenaikan bilangan peroksida ekstrak rempah <i>Cinna-Ale</i> .....	25
Gambar 7. Histogram periode induksi masing-masing sampel .....	26
Gambar 8. Reaksi antara DPPH dengan $H^{\bullet}$ yang berasal dari senyawa peredam radikal bebas .....	27
Gambar 9. Uji Difusi Sumur ekstrak minyak atsiri .....	32
Gambar 10. Uji Difusi Sumur ekstrak heksan .....	34
Gambar 11. Uji Difusi Sumur ekstrak etanol .....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data hasil ekstraksi rempah <i>Cinna-Ale</i> .....	44
Lampiran 2. Nilai absorbansi masing-masing sampel	
Pada panjang gelombang 500 nm .....	45
Lampiran 3. Regresi linear dan periode induksi ekstrak .....	46
Lampiran 4. Aktivitas antioksidan <i>Cinna-Ale</i> metode DPPH .....	47
Lampiran 5. Perhitungan diameter penghambatan bakteri	
metode Difusi Sumur .....	52

## I. PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Beberapa tahun terakhir ini perkembangan penggunaan produk-produk alami semakin meningkat seiring dengan meningkatnya perhatian masyarakat terhadap kesehatan. Salah satu akibatnya adalah peningkatan permintaan konsumen terhadap pangan fungsional. Secara umum, makanan fungsional adalah produk olahan pangan yang mengandung komponen aktif yang mampu mencegah, bahkan menyembuhkan suatu penyakit tertentu untuk mencapai kesehatan tubuh yang optimal (Hesler, 1995).

Di Indonesia, rempah-rempah merupakan unsur penting dalam pembuatan minuman tradisional. Minuman tradisional sudah lama dipercaya sebagai minuman yang memiliki khasiat terhadap kesehatan. Khasiat tersebut diduga berasal dari bahan dasarnya, yaitu rempah-rempah yang berkaitan erat dengan kandungan antioksidannya. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Antioksidan berfungsi untuk menghambat reaksi oksidasi lemak pada bahan pangan. Berbagai kerusakan seperti ketengikan, perubahan nilai gizi, perubahan warna dan rasa, serta kerusakan fisik lain pada produk pangan karena oksidasi dapat dihambat oleh antioksidan.

Selain memiliki kandungan antioksidan yang cukup tinggi, rempah-rempah juga memiliki sifat antimikroba. Senyawa antimikroba digunakan untuk membunuh mikroorganisme yang tidak diinginkan dalam pangan atau untuk mencegah atau menghambat pertumbuhannya (Ray, 2001). Aktivitas antimikroba rempah-rempah tergantung pada satu atau beberapa komponen minyak atsiri dan oleoresinnya.

Keunggulan rempah-rempah dari segi kandungan antioksidan dan antimikrobanya meningkatkan minat banyak peneliti untuk membuat formulasi makanan atau minuman fungsional dengan bahan dasar rempah. Salah satu minuman kesehatan yang terbuat dari rempah-rempah asli Indonesia adalah *Cinna-Ale*. Karakteristik minuman *Cinna-Ale* antara lain berwarna merah, memiliki aroma yang khas, berasa hangat di badan dan

cukup pedas. Nama *Cinna-Ale* diambil dari nama latin kayu manis (*Cinnamomum burmanii* Blume) dan jahe (*Zingiber officinale* Roscoe). Formula minuman *Cinna-Ale* yang terdiri dari 17 rempah yaitu jahe, kayu manis, cabe jawa, secang, lada putih, lada hitam, sereh, daun pandan, kapulaga, kapulaga kecil, fuli, biji pala, adas manis, jinten hitam, cengkeh, pekak, dan kayu mesoyi, sesuai dengan paten No. P002001 00054.

Penelitian mengenai efek *Cinna-Ale* terhadap kesehatan dilakukan oleh Adhiwirawan (2001) yang menyatakan bahwa *Cinna-Ale* memiliki efek hipokolesterolemia dan tidak menyebabkan penyakit jantung koroner. Hal ini berdasarkan penelitian menggunakan tikus *Sparague Dawley* secara *in-vivo*. Hasil penelitian menyatakan bahwa penambahan ekstrak *Cinna-Ale* dengan konsentrasi 10 % (w/v) sebanyak 1 ml/hari sudah cukup menurunkan kadar kolesterol secara nyata. Untuk mendukung hasil penelitian tersebut, perlu dilakukan pengujian terhadap aktivitas antioksidan *Cinna-Ale*. Selain itu perlu diteliti juga mengenai aktivitas antibakterinya sehingga dapat mendukung klaim bahwa minuman ini memiliki ketahanan terhadap bakteri patogen dan perusak sehingga dalam penyimpanannya tidak perlu ditambahkan pengawet sintetis.

Minuman *Cinna-Ale* merupakan ekstrak air dari rempah penyusunnya mengandung oleoresin dan gula, sedangkan dalam penelitian ini yang ingin diketahui aktivitas antioksidan dan antibakteri adalah minyak atsiri, ekstrak non polar dan polar. Oleh karena itu dilakukan ekstraksi bertingkat dari campuran rempah penyusunnya untuk memperoleh ketiga ekstrak yang akan diteliti.

## B. TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan antibakteri minyak atsiri, ekstrak heksan dan ekstrak etanol campuran rempah *Cinna-Ale* serta penentuan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Aktivitas antioksidan diharapkan dapat mendukung klaim *Cinna-Ale* sebagai minuman kesehatan dan daya tahan ekstrak terhadap bakteri uji merupakan temuan yang mendukung penelitian terhadap daya awet minuman *Cinna-Ale*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. CINNA-ALE

*Cinna-Ale* adalah minuman tradisional yang terbuat dari rempah-rempah asli Indonesia dengan karakteristik berwarna merah, beraroma dan rasa yang khas. Beberapa minuman tradisional yang sudah dikembangkan dan diterima di masyarakat, diantaranya sari jahe, sari asem, sari beras kencur. Keunikan *Cinna-Ale* dibandingkan dengan minuman tradisional yang lain adalah komposisi penyusun yang terdiri dari 17 macam rempah-rempah, yaitu jahe (*Zingiber officinale* Roscoe), kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn), cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl), kayu manis (*Cinnamomum burmanii* Blume), sereh (*Adropogon citratus*), lada hitam dan lada putih (*Piper nigrum* L.), pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb), cengkeh (*Syzygium aromaticum*), fuli dan biji pala (*Myristica fragrans* Houtt), adas manis (*Pimpinella anisum*), kapulaga (*Amomum cardamomum* Willd), kapul kecil (*Elettaria cardamomum* L. Maton), jinten hitam (*Carum carvi* L.), pekak (*Illicium verum* Hooker F.), dan kayu mesoyi (*Crypearia mesoyi*).

Pembuatan formula minuman ini terinspirasi oleh minuman tradisional masyarakat Betawi yaitu bir pletok. Keunggulan *Cinna-Ale* dibandingkan dengan bir pletok yaitu : (1) dipilih beberapa jenis rempah sebagai bahan baku utama yang memiliki efek fisiologis terhadap tubuh; (2) kombinasi dengan bahan-bahan lain dalam jumlah sedikit memperkuat khasiat minuman; dan (3) ukuran atau jumlah rempah dalam formula telah distandarkan. Banyaknya rempah-rempah sebagai bahan baku penyusunnya memungkinkan *Cinna-Ale* dikembangkan menjadi minuman kesehatan dengan spektrum khasiat yang luas.

Secara umum peran rempah-rempah dalam minuman *Cinna-Ale* adalah (1) jahe, cabe jawa, lada putih, lada hitam, biji pala, kapulaga dan cengkeh sebagai penghasil rasa pedas dan hangat; (2) daun pandan dan sereh sebagai penghasil bau harum; (3) kayu secang sebagai penghasil warna merah; (4) kayu manis sebagai penghasil aroma yang khas. Menurut Farrel (1990), kayu manis dan cengkeh merupakan rempah-rempah yang sangat efektif sebagai

antimikroba, sedangkan kayu secang juga termasuk rempah-rempah yang mengandung komponen antimikroba. Adanya rempah yang mengandung senyawa antimikroba, maka umur simpan minuman ini dapat meningkat.

## B. TEKNIK EKSTRAKSI REMPAH-REMPAH

Ekstraksi rempah-rempah dengan menggunakan pelarut menghasilkan oleoresin dan *soluble spices* (Farrel, 1990). Pengertian oleoresin berbeda dengan minyak atsiri. Minyak atsiri diperoleh dengan distilasi dan hanya mengandung komponen volatil, sedangkan oleoresin diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik sehingga selain mengandung minyak atsiri juga mengandung resin yang bersifat non volatil.

Metode ekstraksi yang dilakukan tergantung pada beberapa faktor, antara lain : (1) tujuan dilakukan ekstraksi, (2) skala ekstraksi, (3) sifat-sifat komponen yang akan diekstraksi, dan (4) sifat-sifat pelarut yang akan digunakan (Houghton dan Raman, 1998). Beberapa metode ekstraksi yang sering digunakan yaitu ekstraksi dengan pelarut, distilasi, *supercritical fluid extraction* (SFE), pengepresan mekanik, dan sublimasi. Metode yang banyak dilakukan adalah distilasi dan ekstraksi dengan pelarut.

Prinsip metode ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut selama waktu tertentu, kemudian diikuti dengan pemisahan pelarut dari bahan yang telah diekstrak. Secara umum proses ekstraksi menggunakan pelarut organik dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu maserasi, digestion dan perkolasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi dengan penghancuran sampel menggunakan pelarut, perendaman beberapa hari dan dilakukan pengadukan, kemudian dilakukan penyaringan atau pengepresan sehingga diperoleh cairan. Digestion adalah ekstraksi yang dilakukan dengan bantuan pemanasan sekitar 60 °C dan lamanya ekstraksi dapat berlangsung selama 24 jam. Perkolasi merupakan proses ekstraksi komponen terlarut dari suatu sampel menggunakan aliran pelarut dengan pemanasan atau tanpa pemanasan (Reineccius, 1997).



### C. ANTIOKSIDAN DAN MEKANISME ANTIOKSIDASI

Antioksidan merupakan zat yang mempunyai fungsi berlawanan dengan zat yang bernama oksidan. Zat oksidan atau yang dikenal dengan nama radikal bebas merupakan atom atau molekul yang sifatnya sangat tidak stabil (mempunyai satu atau lebih elektron tanpa pasangan), sehingga untuk memperoleh pasangan elektron senyawa ini sangat reaktif dan merusak jaringan. Senyawa radikal bebas tersebut disebabkan berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, berupa hasil sampingan dari proses oksidasi (pembakaran) sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan atau ketika tubuh terpapar polusi lingkungan seperti asap kendaraan bermotor, asap rokok, bahan pencemar, dan radiasi matahari (Karyadi,1997).

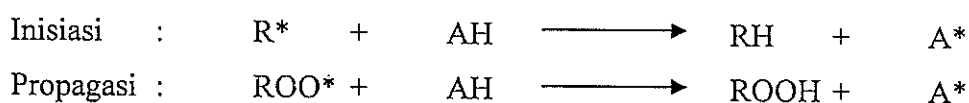
Reaksi pembentukan radikal bebas merupakan mekanisme biokimia tubuh normal. Radikal bebas umumnya hanya bersifat perantara yang dapat dengan cepat diubah menjadi substansi yang tidak lagi membahayakan tubuh. Tetapi jika radikal bebas berada dalam jumlah berlebihan sementara jumlah antioksidan seluler tetap atau lebih sedikit, maka kelebihannya tidak bisa dinetralkan dan berakibat pada kerusakan sel, antara lain : kerusakan DNA pada inti sel, kerusakan membran sel, kerusakan protein, kerusakan lipid peroksida, dan dapat menimbulkan autoimun (Karyadi,1997).

Menurut Karyadi (1997), antioksidan tubuh dikelompokkan menjadi tiga yaitu : (1) antioksidan primer, berfungsi untuk mencegah pembentuk senyawa radikal bebas baru. Antioksidan primer mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya sebelum radikal bebas ini sempat bereaksi; (2) antioksidan sekunder, berfungsi menangkap senyawa serta mencegah terjadinya reaksi berantai; (3) antioksidan tersier, berfungsi memperbaiki kerusakan sel-sel dan jaringan yang disebabkan radikal bebas.

Sesuai mekanisme kerjanya, antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ( $R^*$ ,  $ROO^*$ ) atau mengubahnya ke

bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A\*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autoksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autoksidasi dengan pengubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil (Gordon, 1990).

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autoksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi (Gambar 1). Radikal-radikal antioksidan (A\*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (Gordon, 1990).



Gambar 1. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida (Gordon, 1990).

Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan (Gambar 2). Pengaruh jumlah konsentrasi pada laju oksidasi tergantung pada struktur antioksidan, kondisi dan sampel yang akan diuji.



Gambar 2. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi (Gordon, 1990).

#### D. METODE PENGUKURAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

Aktivitas antioksidan dapat dievaluasi dengan cara menentukan proteksi antioksidan terhadap oksidasi minyak atau lemak, dengan kata lain sejauh mana daya tahan minyak atau lemak tersebut terhadap proses oksidasi. Penentuan aktivitas antioksidan dapat dilakukan pada tahap oksidasi yang

berbeda, yaitu tahap awal oksidasi menghasilkan produk primer seperti bilangan peroksida (PV), diene terkonjugasi dan pada tahap oksidasi selanjutnya yang menghasilkan produk sekunder yang lebih stabil seperti heksanal, asam karboksilat volatil dan sebagainya. Oleh karena itu, waktu pengambilan contoh selama proses oksidasi adalah hal kritis untuk menghasilkan analisis oksidasi yang valid. Tingkatan oksidasi seharusnya ditentukan dalam selang waktu dengan lebih dari satu metode pengukuran dan dengan pengukuran jenis produk oksidasi yang berbeda yaitu produk awal (primer) dan produk dekomposisi (sekunder) dari autoksidasi lipid.

### **1. Metode Sistem Model $\beta$ -karoten/linoleat**

Metode ini 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. Beberapa jenis antioksidan seperti BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole) dan PG (propil galat) telah dievaluasi dengan metode ini (Kochhar dan Rossell, 1990).

### **2. Metode Diene Terkonjugasi**

Lipid yang mengandung metilene diselingi oleh diene atau poliene menunjukkan suatu geseran pada posisi ikatan rangkap selama oksidasi karena pembentukan isomerisasi dan konjugasi. Pembentukan diene atau triene terkonjugasi proporsional dengan konsumsi oksigen dan pembentukan peroksida selama tahap awal oksidasi. Diene terkonjugasi yang dihasilkan menunjukkan intensitas absorpsi pada 234 nm (White, 1995)

Metode diene terkonjugasi 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. Tetapi metode ini tidak dapat diaplikasikan pada

semua jenis minyak karena nilai diene terkonjugasi tergantung pada komposisi asam lemak minyak tersebut. Metode diene terkonjugasi sering diaplikasikan pada minyak yang mengandung asam linoleat atau asam lemak tak jenuh lainnya seperti minyak kedelai dan minyak jagung. Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode diene terkonjugasi dinyatakan dalam satuan mmol/kg minyak.

### 3. Metode Rancimat

Prinsip metode ini adalah oksidasi dipercepat dengan cara induksi aliran udara melewati minyak yang dipanaskan, misalnya  $\pm 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Produk oksidasi sekunder dari autoksidasi adalah senyawa volatil dan ionik, dekomposisi hidroperoksida ionik menghasilkan asam format. Reaksi autoksidasi bisa menghasilkan hidroperoksida dan juga asam format atau lebih umum lagi adalah pembentukan senyawa ionik yang dapat mengubah konduktivitas dari air bebas ion pada alat Rancimat (Loliger, 1983).

Pada awal reaksi oksidasi tidak ada peningkatan konduktivitas yang dapat diamati dan hanya pada tahap selanjutnya terjadi peningkatan konduktivitas secara cepat (periode induksi). Umumnya pada suhu ruang, periode induksi dihasilkan pada hitungan minggu atau bulan. Oleh karena itu perlu uji yang dipercepat, biasanya dilakukan pada suhu  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau sampai  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$  untuk minyak/lemak yang sangat stabil (Loliger, 1983). Besarnya aktivitas antioksidan dapat diketahui dari besarnya penghambatan terhadap pembentukan senyawa oksidan (periode induksi) yang disebabkan oleh pemanasan pada minyak.

### 4. Metode Tiosianat

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode Tiosianat adalah suatu mekanisme pengukuran aktivitas antioksidan dalam menghambat terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Uji ini mengukur jumlah peroksida secara kualitatif. Pengukuran aktivitas dapat dinyatakan dalam periode induksi dan faktor protektif. Periode induksi adalah waktu yang dibutuhkan untuk mencapai nilai absorbansi

0.3 pada panjang gelombang 500 nm (Chen *et al.*, 1995). Menurut Taylor dan Richardson (1980), aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai faktor protektif. Faktor protektif didapat dari perbandingan periode induksi sampel (hari) dengan periode induksi kontrol (hari). Semakin tinggi faktor protektif maka aktivitas antioksidannya semakin meningkat.

### 5. Metode Scavenging Effect on DPPH Radical

DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazil) merupakan senyawa radikal bebas yang stabil. Prinsip metode ini adalah mengukur daya peredaman sampel (ekstrak) terhadap radikal bebas DPPH (Hatano *et al.*, 1988). DPPH akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas dan menjadi DPP Hidrazin yang lebih stabil. Senyawa peredam radikal bebas yang telah bereaksi dengan DPPH akan menjadi radikal baru yang stabil atau senyawa bukan radikal. Aktivitas antioksidan dengan pengukuran metode ini dinyatakan sebagai nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ ) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50 %. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan.

## E. REMPAH-REMPAH SEBAGAI ANTIOKSIDAN ALAMI

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin dan flavanon), derivat asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam organik polifungsional (Pratt dan Hudson, 1990). Senyawa antioksidan alami polifenolik ini dapat beraksi sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam, (d) peredam terbentuknya singlet oksigen.

Ada banyak bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, seperti rempah-rempah, dedaunan, teh, kakao, biji-bijian, sereal, buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan/alga laut. Rempah-rempah sudah sejak lama dikenal kegunaannya untuk manusia, misalnya untuk memberi aroma dan rasa pada makanan, obat-obatan, atau memiliki sifat antiseptik. Tanaman rempah dan bumbu yang memiliki kemampuan pencegahan kanker telah diidentifikasi antara lain dari famili Labiatae (oregano, sage, rosemary dan

thyme), *Allium* sp. (bawang putih, bawang merah dan lokio), Zingiberaceae (kunyit dan jahe), Umbelliferae (adas manis, jinten, seledri, ketumbar, peterseli, dill, cumin, cilantro) dan akar licorice (Caragay, 1992).

Senyawa-senyawa fenolik volatil seperti eugenol, thymol, curcumin dan capsaicin dan lain-lain memiliki aktivitas antioksidan menonjol, tapi memiliki *odor* yang terlalu kuat sehingga membatasi kegunaannya sebagai bahan tambahan pangan. Oleh karena itu, penelitian dialihkan pada isolasi komponen aktif antioksidan dari fraksi-fraksi non volatil yang memiliki sifat antioksidan, tidak berbau, berasa dan tidak berwarna. Kemudian lebih lanjut penelitian ditekankan pada senyawa-senyawa fenolik non volatil yang memiliki aktivitas antioksidan (Nakatani, 1992 dikutip Trilaksani, 2003).

#### **F. REMPAH-REMPAH SEBAGAI ANTIMIKROBA**

Senyawa antimikroba digunakan dalam jumlah yang relatif sedikit pada pangan. Senyawa tersebut berfungsi untuk membunuh mikroorganisme atau mencegah atau menghambat pertumbuhannya. Kemampuan antimikroba dalam menghambat mikroorganisme berbeda untuk setiap jenisnya. Zat antimikroba yang mampu membunuh mikroorganisme dibedakan menjadi germisidal (membunuh semua jenis mikroorganisme), fungisidal, bakterisidal, sporisidal, dan virisidal. Antimikroba yang mampu mencegah atau menghambat pertumbuhan mikroba dikelompokkan menjadi fungistatik atau bakteriostatik (Ray, 2001).

Menurut Branen dan Davidson (1993), komponen antimikroba menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara : (1) bereaksi dengan membran sel yang menyebabkan peningkatan permeabilitas dan hilangnya unsur penyusun sel, (2) inaktivasi enzim esensial, atau (3) merusak atau inaktivasi fungsi dari materi genetik. Menurut Hirasu dan Takemasa (1998), efek antimikroba banyak ditemukan pada komponen volatil dari minyak atsiri rempah. Daya tahan beberapa jenis mikroba terhadap suatu jenis rempah-rempah yang sama mungkin berbeda, begitu pula pada mikroba yang sama dapat memiliki daya tahan yang bervariasi terhadap berbagai jenis rempah-rempah.

Beberapa senyawa kimia yang memiliki sifat sebagai antimikroba adalah fenol dan senyawa fenolik, alkohol, halogen, logam berat, detergen dan senyawa amonium kuartener (Pelczar *et al.*, 1993). Komponen fenol dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap germinasi spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam proses germinasi. Mekanisme senyawa fenol sebagai antimikroba adalah dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel, serta mengendapkan protein sel bakteri. Senyawa fenolik yang berat molekulnya besar mampu menginaktifkan enzim esensial yang terdapat dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi rendah. Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan sifat kelarutan dan kestabilan komponen fenolik (Nychas, 1995).

## G. KARAKTERISASI BAKTERI PATOGEN DAN PERUSAK MAKANAN

### 1. *Escherichia coli*

Organisme ini pertama kali dinamakan *Bacterium coli*, diisolasi dari feses bayi oleh Escherich. Pada tahun 1920, organisme ini dinamakan *Escherichia* dan bakteri ini menyebabkan gastroenteritis dengan resiko kematian pada bayi. Pada saat ini terdapat 4 jenis *E. coli* patogen yang sering menyebabkan penyakit : *enteropathogenic* (EPEC), *enterotoxigenic* (ETEC), *enteroinvasive* (EIEC) dan *enterohaemorrhagic E. coli* (*E. coli* O157:H7; EHEC) (ICMSF, 1996).

Bakteri *Escherichia coli* adalah anggota dari famili Enterobacteriaceae. Bakteri ini tergolong sebagai bakteri Gram negatif, katalase positif, oksidase negatif, bersifat anaerobik fakultatif, dan berbentuk batang. *E. coli* bersifat metil red positif, Voges-Proskauer negatif, memproduksi indole, dan tidak dapat tumbuh pada medium Simmons sitrat (IMViC + + - - atau - + - -). Pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) *E. coli* akan menghasilkan koloni berwarna gelap dan bersinar hijau metalik (Robinson *et al.*, 2000).

Makanan dapat terkontaminasi *E. coli* karena rendahnya higiene pekerja yang menangani makanan atau dari air yang terkontaminasi. Hal yang penting dilakukan untuk mencegah keracunan akibat *E. coli* adalah

melatih pekerja dalam teknik penanganan makanan yang aman, meningkatkan higiene pekerja, memanaskan makanan untuk membunuh patogen dan menyimpannya pada kondisi yang tidak memungkinkan bakteri untuk memperbanyak diri. Makanan yang berasal dari hewan harus cukup matang sebelum dikonsumsi. Daging mentah atau setengah matang dan susu yang tidak dipasteurisasi harus dihindari. Pengolahan sayuran juga harus diperhatikan agar tidak terjadi kontaminasi setelah proses pemasakan yang disebabkan peralatan yang tidak bersih atau kontaminasi silang dari bahan pangan hewani. Dosis *E. coli* O157:H7 untuk menginfeksi sangat rendah dan pertumbuhannya dalam daging dapat dikontrol dengan pendinginan pada suhu kurang dari 7 °C setelah penyembelihan dan pengolahan (ICMSF, 1996).

## 2. *Salmonella* Typhimurium

Bakteri ini termasuk dalam famili Enterobacteriaceae, merupakan anggota dari bakteri Gram negatif, anaerobik fakultatif, berbentuk batang dan tidak berspora. *Salmonella* bersifat katalase positif, oksidase negatif dan mereduksi nitrat menjadi nitrit. Reaksi dengan metil red positif, uji Voges-Proskauer negatif dan tidak memproduksi indole. Suhu untuk pertumbuhan *S. Typhimurium* berkisar antara 5.2 – 46.2 °C dengan suhu optimum 35 – 43 °C. Nilai pH untuk pertumbuhan *S. Typhimurium* berkisar antara 3.8 – 9.5 dan nilai pH optimum 7 – 7.5. Aktivitas air ( $A_w$ ) minimum yang dibutuhkan *S. Typhimurium* adalah 0.94 dan maksimumnya lebih dari 0.99, dengan  $A_w$  optimum 0.99 (ICMSF, 1996).

Bakteri genus *Salmonella* merupakan bakteri penyebab infeksi yang jika tertelan dan masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan gejala yang disebut Salmonellosis. Jumlah *Salmonella* yang dapat menyebabkan Salmonellosis pada umumnya berkisar antara  $10^7$  sampai dengan  $10^9$  sel/g, walaupun ada juga beberapa penelitian yang menyebutkan Salmonellosis terjadi setelah mengkonsumsi makanan yang mengandung *Salmonella* lebih rendah dari  $10^7$  –  $10^9$  sel/g. Contohnya adalah keracunan *S. eastbourne* pada coklat dengan jumlah sel *Salmonella* antara 10 000 sel/g,



keracunan *S. cubana* dalam padatan *carmine dye* dengan jumlah sel *Salmonella* antara 15 000 sel/g (Jay, 2000).

### 3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* adalah spesies dari genus *Staphylococcus*, merupakan bakteri Gram positif dan katalase positif. *Staphylococcus* memiliki morfologi yang hampir sama dengan genus *Micrococcus* tetapi *Staphylococcus* tumbuh secara anaerobik dan menunjukkan sistem metabolisme anaerobik fakultatif. Suhu optimum pertumbuhan *S. aureus* adalah 37 °C, dengan suhu minimum 7 °C dan suhu maksimum 48 °C. *S. aureus* dapat tumbuh pada pH 4.0 – 10.0 dengan pH optimum sekitar 6.0 – 7.0 dan memiliki Aw optimum 0.98 (ICMSF, 1996).

Enterotoksin *Staphylococcus* memiliki berat molekul yang rendah (26000 – 34000 Da) dan merupakan protein rantai tunggal. Enterotoksin ini memiliki 7 jenis antigen yaitu (SEA, SEB, SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SED dan SEE). Komposisi asam amino enterotoksin SEA, SED dan SEE dengan enterotoksin SEB, SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub> dan SEC<sub>3</sub> adalah sama. Enterotoksin tersebut dihasilkan oleh organisme dengan 2 cara berbeda. Produksi SEB dan SEC dikontrol plasmid atau kromosomal dan dihasilkan pada akhir fase stasioner sebagai metabolit sekunder. Sedangkan SEA dan SEE dikontrol kromosom (SED dikontrol plasmid) dan dihasilkan pada fase logaritmik. Sebagian besar kasus keracunan makanan disebabkan oleh enterotoksin tipe A dan D yang memiliki kisaran nilai pH dan Aw lebih luas dibanding B dan C. Jumlah enterotoksin yang dapat menyebabkan sakit tergantung sensitifitas masing-masing individu, tetapi biasanya jumlah 0.1 – 1 µg/kg sudah dapat menyebabkan sakit pada manusia (ICMSF, 1996).

*Staphylococcus aureus* tidak kuat bersaing dengan bakteri lainnya dan jarang menyebabkan keracunan makanan pada bahan mentah, kecuali susu yang dihasilkan dari sapi mastitis yang memiliki kadar *S. aureus* sangat tinggi. *Staphylococci* dapat hilang dengan pemasakan tetapi toksin yang dihasilkan akan tetap bertahan. Toksin ini juga tahan selama proses

sterilisasi makanan kaleng berasam rendah. Bakteri ini juga tahan terhadap pengeringan dan dapat tumbuh dan memproduksi enterotoksin pada produk yang memiliki Aw rendah (0.85) (ICMSF, 1996).

#### 4. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang ( $0.5 - 0.8 \times 1.5 - 8 \mu\text{m}$ ), motil dengan flagela polar, dan terdapat dalam keadaan tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek. Suhu pertumbuhan optimum bagi *P. aeruginosa* adalah  $37^\circ\text{C}$ , dapat juga tumbuh pada suhu tinggi  $42^\circ\text{C}$  tapi tidak pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Bakteri ini memiliki Aw minimum untuk pertumbuhannya  $0.96 - 0.98$ , dan pH minimum 5.6 dengan pH optimum  $6.6 - 7.0$  dan maksimum  $8.0 - 9.0$ .

Secara umum, *P. aeruginosa* adalah bakteri yang terdapat dimana-mana terutama di lingkungan yang lembab dengan ketersediaan nutrisi dan kekuatan ion yang rendah. Bakteri ini dapat diisolasi dari permukaan air, tanah dan vegetasi termasuk sayuran dan salad. Keberadaan *P. aeruginosa* dalam air minum dan sayuran dapat menyebabkan *food borne disease*. *P. aeruginosa* tidak menyerang jaringan sehat normal tetapi dapat menyebabkan infeksi serius pada jaringan yang rusak dan terekspos virulen (ICMSF, 1996).

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. BAHAN DAN ALAT

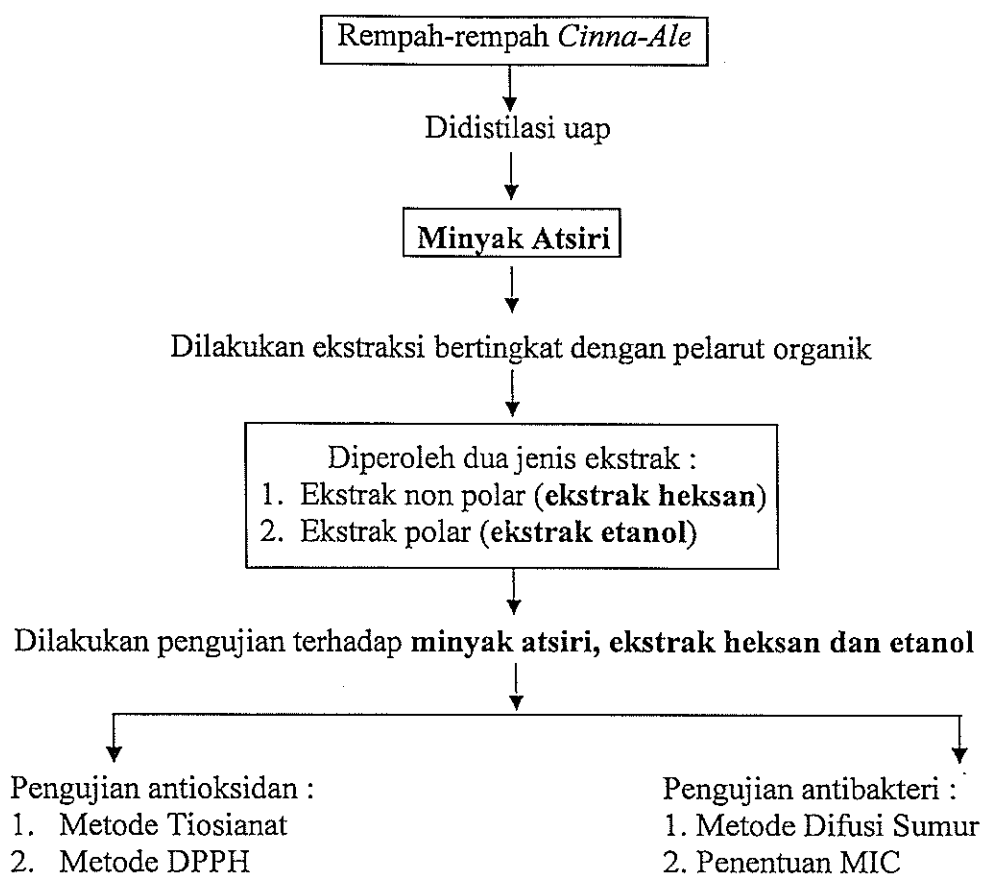
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rempah-rempah untuk *Cinna-Ale* yaitu jahe, secang, kayu manis, cabe jawa, sereh, lada putih, lada hitam, daun pandan, cengkeh, fuli, biji pala, adas manis, kapulaga, kapul kecil, jinten hitam, pekak dan kayu mesoyi. Rempah-rempah tersebut diperoleh dari Balitro (Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat) Bogor dan pasar tradisional Bogor.

Bahan-bahan kimia yang dibutuhkan yaitu heksan analisis, etanol analisis, etanol absolut, metanol, BHT,  $\alpha$ -tocoferol, asam linoleat, amonium tiosianat, buffer phosphat, besi (II) klorida, HCl, larutan  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH), air bebas ion dan akuades. Sedangkan bahan-bahan yang dibutuhkan untuk analisa antibakteri yaitu kultur mikroba *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, media *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), *Plate Count Agar* (PCA) dan pelarut *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).

Peralatan yang digunakan adalah alat ekstraksi refluks, *oven vacum*, *freeze dryer*, corong, kertas whatman No. 1, rotavapor, inkubator 37 °C, spektrofotometer, pipet, mikropipet, cawan petri, tabung reaksi, bunsen, ose dan peralatan gelas.

#### B. METODE PENELITIAN

Penelitian ini terbagi menjadi tiga tahapan yaitu ekstraksi campuran rempah penyusun minuman, pengukuran aktivitas antioksidan dan pengujian antibakteri rempah. Tahap ekstraksi campuran rempah penyusun minuman menghasilkan tiga ekstrak yaitu minyak atsiri, ekstrak heksan dan ekstrak etanol. Pengukuran aktivitas antioksidan ketiga ekstrak dilakukan dengan metode Tiosianat dan metode DPPH. Aktivitas antibakteri ekstrak diuji dengan metode Difusi Sumur dan ditentukan nilai MIC masing-masing ekstrak. Alur tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.



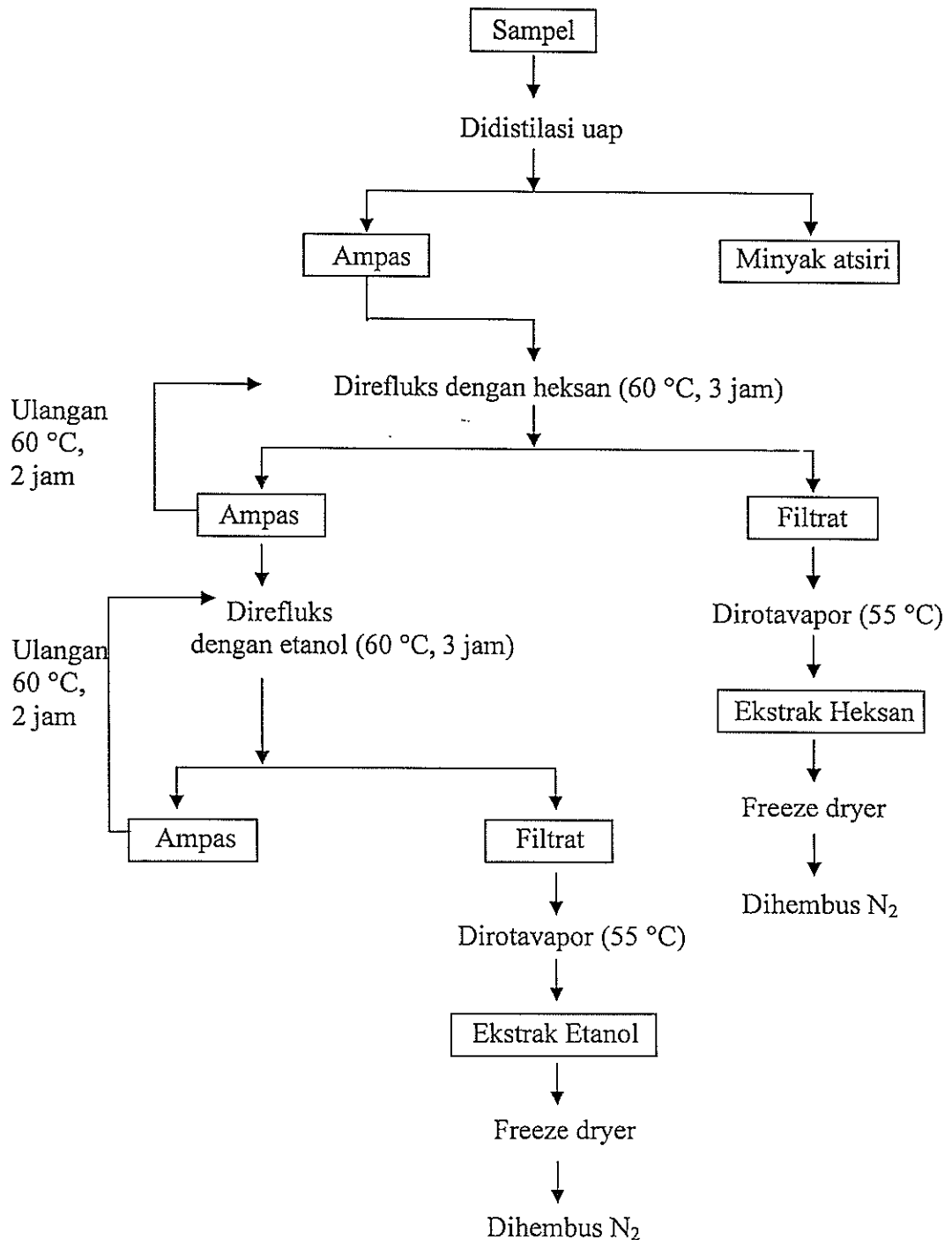
Gambar 3. Alur tahapan penelitian

### 1. Persiapan Ekstrak *Cinna-Ale*

Rempah-rempah dikeringkan terlebih dahulu dengan oven vakum (suhu 50 °C). Setelah itu dilakukan pengecilan ukuran rempah. Semua bahan rempah ditimbang sesuai dengan formulasi campuran rempah sebesar 1 % (w/v).

Minyak atsiri diperoleh dengan metode Distilasi Uap. Prinsip kerja distilasi uap adalah uap dialirkan dari suatu bejana uap ke dalam bahan. Setelah bahan banyak teruapi maka bahan akan mendidih, air dan minyak naik melalui uap air lalu mengalami kondensasi. Distilat yang diperoleh terdiri dari dua lapisan yaitu minyak dan air. Distilat diekstraksi untuk memisahkan minyak dari air. Selama penyulingan berlangsung, suhu diawasi agar tetap terkontrol. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan rendemen minyak yang lebih besar dan memudahkan pengeringan bahan yang disuling.

Ampas rempah kemudian dikeringanginkan dan dilakukan ekstraksi bertingkat dengan pelarut non polar (heksan) dan polar (etanol). Rendemen masing-masing ekstrak dihitung berdasarkan berat bahan awal sebelum distilasi uap. Diagram alir ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram alir ekstraksi metode Refluks

### Cara menghitung rendemen :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat bahan awal (g)}} \times 100 \%$$

## 2. Pengujian Aktivitas Antioksidan Secara Kimia dengan Metode Tiosianat (Chen *et al.*, 1995)

Sebanyak 200 ppm sampel ekstrak rempah dilarutkan dalam emulsi 2 ml asam linoleat 50 mM dalam etanol 99.8 %, 2 ml buffer fosfat 0.1 M pH 7.0 dan 1 ml air bebas ion. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C. Tiap dua hari contoh diambil sebanyak 50 µl untuk diuji dengan penambahan 2.35 ml etanol 75 %, 50 µl amonium tiosianat 30 %, 50 µl FeCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 20 mM dalam HCl 3.5 %. Setelah 3 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Nilai pengukuran absorbansi dinyatakan sebagai bilangan peroksida. Perhitungan periode induksi diperoleh dari persamaan regresi linier masing-masing sampel antara nilai absorbansi dan lamanya penyimpanan.

Persamaan regresi linier	:	$Y^* = Bx + A$
--------------------------	---	----------------

\* Nilai Y masing-masing sampel adalah 0.3 (ketetapan), A dan B diketahui sehingga periode induksi (x) dapat dihitung.

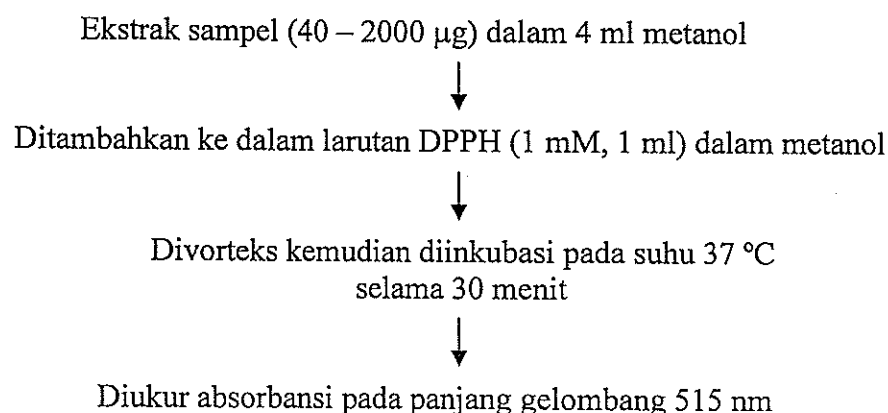
Perhitungan jumlah sampel yang harus dilarutkan dalam emulsi :

$$\begin{aligned} 200 \text{ ppm didalam } 5 \text{ ml emulsi} &= 200 \text{ mg/1000 ml} \times 5 \text{ ml} \\ &= 1 \text{ mg} \end{aligned}$$

Didalam emulsi asam linoleat harus terdapat sampel ekstrak sebesar 1 mg.

## 3. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) (Hatano *et al.*, 1988)

Aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur efek peredaman terhadap radikal bebas DPPH. Alur pengujian dengan metode ini dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram alir uji aktivitas antioksidan metode DPPH

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan bilangan  $IC_{50}$ . Persentase penghambatan (inhibisi) diperoleh dari nilai absorbansi blanko dikurangi absorbansi sampel. Persamaan garis diperoleh dari hubungan antara konsentrasi dengan persentase penghambatan. Sehingga nilai  $IC_{50}$  dapat dihitung :

Persamaan regresi linier : $Y^* = Bx + A$
---

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

#### 4. Pengujian Aktivitas Antibakteri Menggunakan Uji Difusi Sumur (Garriga *et al.*, 1993)

Ekstrak dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 4 % (w/v) kemudian disonikator selama 15 menit dan dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan uji Difusi Sumur. Untuk melakukan analisa, kultur bakteri yang akan diuji harus disegarkan terlebih dahulu dengan menginokulasi satu ose kultur murni dari agar miring *Nutrient Agar* (NA) ke dalam 10 ml medium cair *Nutrient Broth* (NB) secara aseptik. Kultur uji kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Medium *Nutrient Agar* (NA) steril dipersiapkan dan didinginkan sampai suhu 50 °C. Sebanyak 0.2 % kultur segar dari media *Nutrient*

*Broth* (NB) diinokulasikan ke dalam 20 ml *Nutrient Agar* (NA). Campuran media dan kultur uji tersebut dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga membeku. Selanjutnya dibuat lubang-lubang sumur (4 sumur per cawan) dengan diameter 6.2 mm. Sebanyak 60 µl ekstrak rempah dimasukkan ke dalam 2 lubang sumur dan ke dalam 2 sumur lainnya masing-masing dimasukkan 60 µl kontrol positif (*amoxycillin* 0.05 %) dan 60 µl kontrol negatif (DMSO). Agar cawan tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Data yang diperoleh adalah selisih diameter penghambatan sampel dengan diameter penghambatan kontrol positif. Diameter penghambatan diperoleh dari selisih diameter areal bening dengan diameter sumur. Selanjutnya dilakukan perhitungan diameter penghambatan untuk setiap gram ekstrak dan gram bahan.

**Aktivitas antibakteri (mm/gram ekstrak) =**

$$\frac{\text{Volume ekstrak } (\mu\text{l})}{\text{Volume uji } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{Diameter penghambatan (mm)}}{\text{Bobot ekstrak uji (g)}}$$

**Aktivitas antibakteri (mm/gram bahan) =**

$$\frac{\text{Volume ekstrak } (\mu\text{l})}{\text{Volume uji } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{d.p (mm)}}{\text{Bobot ekstrak uji (g)}} \times \frac{\text{Bobot total ekstrak (g)}}{\text{Bobot bahan awal (g)}}$$

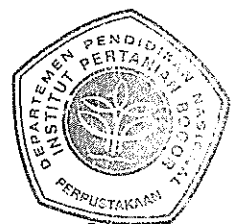
d.p = diameter penghambatan

##### 5. Penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) pada Agar Cawan (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 dan 25 mg/ml medium berdasarkan berat bubuk rempah. Untuk pengujian dilakukan penggoresan suspensi bakteri ( $10^6$  koloni/ml) pada permukaan agar PCA. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C, dilakukan pengamatan ada atau tidak adanya pertumbuhan bakteri.



Selanjutnya dilakukan pembuatan agar cawan PCA yang mengandung ekstrak dengan selang konsentrasi 0.5 mg/ml medium sehingga didapatkan konsentrasi terendah dimana mikroorganisme tidak dapat hidup dan konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MIC.



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. PERSIAPAN EKSTRAK REMPAH *CINNA-ALE*

Persiapan bahan baku mencakup pengeringan bahan (kadar air 9.17 % basis kering) dan penggilingan yang bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi. Ekstraksi rempah dilakukan untuk mendapatkan tiga komponen yaitu minyak atsiri, ekstrak heksan dan ekstrak etanol. Masing-masing komponen diukur aktivitas antioksidan dan antibakterinya.

Rempah-rempah basah dikeringkan dengan oven vakum (suhu 50 °C) untuk mencegah hilangnya komponen volatil pada bahan. Penggilingan atau pengecilan ukuran rempah juga penting karena bahan yang akan diekstraksi sebaiknya berukuran seragam untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut. Ukuran partikel yang kecil membuat luas permukaan menjadi lebih besar dan memudahkan dalam hal ekstraksi komponen dari suatu bahan.

Minyak atsiri diperoleh dengan metode Distilasi Uap. Setelah minyak atsiri diperoleh, ampas rempah dikeringanginkan dan dilakukan ekstraksi bertingkat menggunakan pelarut organik. Tahapan proses ekstraksi dengan pelarut meliputi persiapan bahan mentah, pencampuran dengan pelarut, pemisahan bahan pelarut dari residunya, penguapan dan pemekatan pelarut.

Kemampuan pelarut untuk mengekstrak komponen adalah hal yang penting diperhatikan. Bahan kering diekstraksi dengan menggunakan berbagai macam pelarut dengan tingkat kepolaran dari rendah ke tinggi (Davidson dan Naidu, 2000). Ekstraksi dilakukan secara berurutan menggunakan pelarut heksan (non polar) kemudian etanol (polar), sehingga akan diperoleh ekstrak yang mengandung senyawa non polar dan polar. Pelarut heksan akan melarutkan komponen non polar seperti lilin, lemak, terpenoid, sedangkan pelarut etanol akan melarutkan senyawa polar seperti tanin, fenolik, gula dan asam amino tertentu.

Kondisi proses ekstraksi yang berpengaruh adalah lama ekstraksi, suhu dan jenis pelarut yang digunakan. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode Refluks pada suhu sekitar 60 °C selama tiga jam. Suhu dijaga agar tetap stabil karena suhu ekstraksi yang terlalu tinggi dan waktu yang terlalu lama

dapat menyebabkan komponen volatil menguap dan terjadi proses degradasi serta oksidasi sehingga aktivitas ekstrak menjadi menurun. Komposisi, aroma, warna dan rendemen yang dihasilkan dari proses ekstraksi rempah-rempah dipengaruhi oleh jenis, ukuran, serta metode ekstraksi. Pada ekstraksi rempah-rempah diharapkan selain komponen aktifnya dapat terekstrak, komponen volatil yang terdapat di dalamnya juga dapat terekstrak, sehingga masih terdapat aroma khas rempah-rempah. Data hasil ekstraksi dapat dilihat pada Lampiran 1, sedangkan rendemen ekstrak seperti yang tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak rempah *Cinna-Ale*

Jenis ekstrak	Rendemen*	Warna	Aroma
Minyak atsiri	1.56 % (w/w)	Kuning	Khas campuran rempah
Ekstrak heksan	1.39 % (w/w)	Hijau pekat	Khas campuran rempah
Ekstrak etanol	8.81 % (w/w)	Coklat gelap	Menyengat

Keterangan : \*Rendemen = bobot ekstrak/bobot bahan awal

Rendemen tertinggi diperoleh dari ekstrak etanol (ekstrak polar) yaitu 8.81 % (w/w). Tingginya rendemen ekstrak polar dapat disebabkan oleh keberadaan komponen polar yang dapat terekstrak dalam etanol lebih banyak dibandingkan komponen non polar. Tingginya rendemen ekstrak polar dapat juga diartikan komponen rempah-rempah *Cinna-Ale* sebagian besar merupakan senyawa polar (tanin, fenolik dan gula). Senyawa non polar (lilin, lemak dan terpenoid) jumlahnya sangat sedikit dilihat dari rendemen ekstrak heksan yang rendah (1.39 % w/w).

## B. PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE TIOSIANAT (Chen *et al.*, 1995)

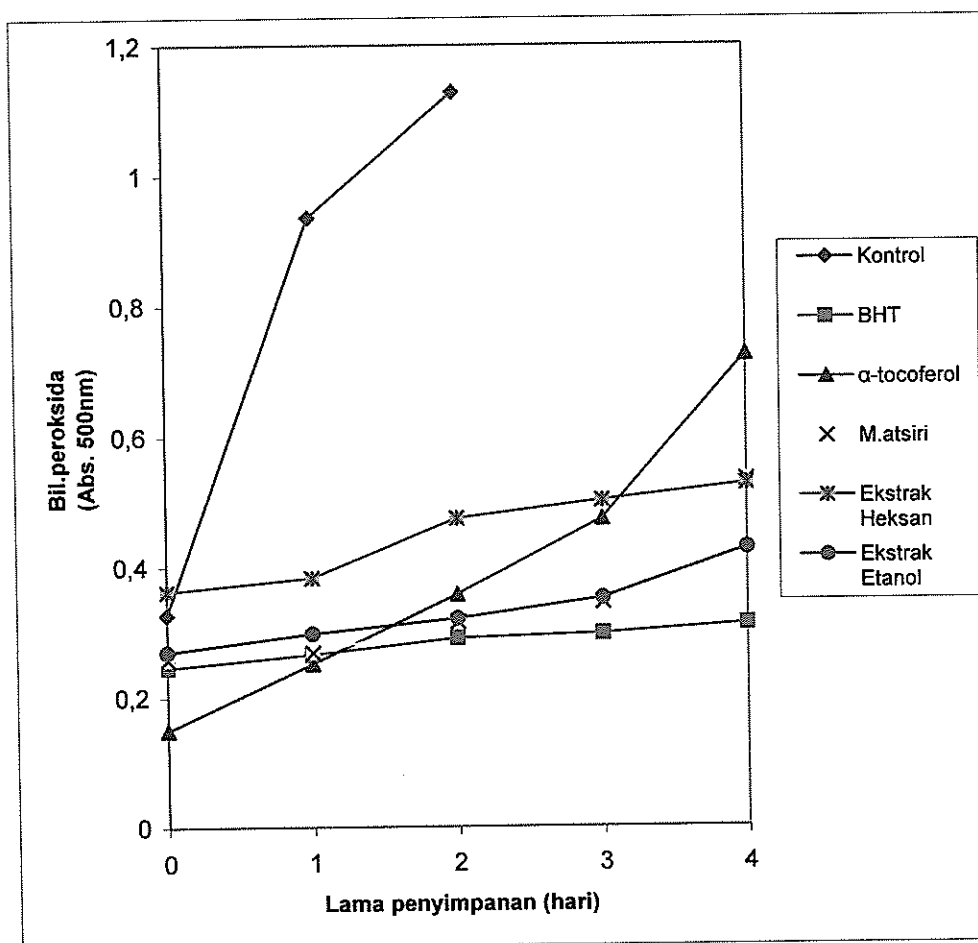
Pengukuran aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode Tiosianat adalah suatu mekanisme pengukuran aktivitas antioksidan dalam menghambat terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Uji ini mengukur jumlah peroksida secara kualitatif. Asam linoleat dalam kondisi

buffer pada suhu 37°C selama penyimpanan akan teroksidasi dan menghasilkan peroksida. Peroksida ini akan mengoksidasi ion fero dari  $\text{FeCl}_2$  menjadi ion feri ( $\text{FeCl}_3$ ) yang akan membentuk warna merah jika direaksikan dengan amonium tiosianat. Semakin banyak peroksida yang terbentuk maka semakin merah intensitas warna yang dihasilkan. Adanya antioksidan akan menghambat oksidasi, sehingga peroksida yang bereaksi dengan ion fero semakin sedikit dan periode induksi sampel semakin panjang.

Menurut Chen *et al.* (1996) konsentrasi dan pH buffer fosfat mempengaruhi autoksidasi asam linoleat. Autoksidasi akan tinggi dengan semakin menurunnya pH. Sebaliknya, konsentrasi buffer fosfat yang tinggi akan menurunkan laju oksidasi, sehingga memperpanjang periode induksi. Oleh karena itu, konsentrasi dan pH buffer harus terkontrol pada saat pengukuran aktivitas antioksidan.

Pengukuran aktivitas antioksidan didasarkan pada besarnya kekuatan antioksidan mereduksi atau menghambat hasil-hasil dari oksidasi maupun mereduksi radikal bebas. Asam linoleat yang mengalami oksidasi akan menghasilkan radikal peroksida yang sangat reaktif dan bersifat sebagai radikal bebas.

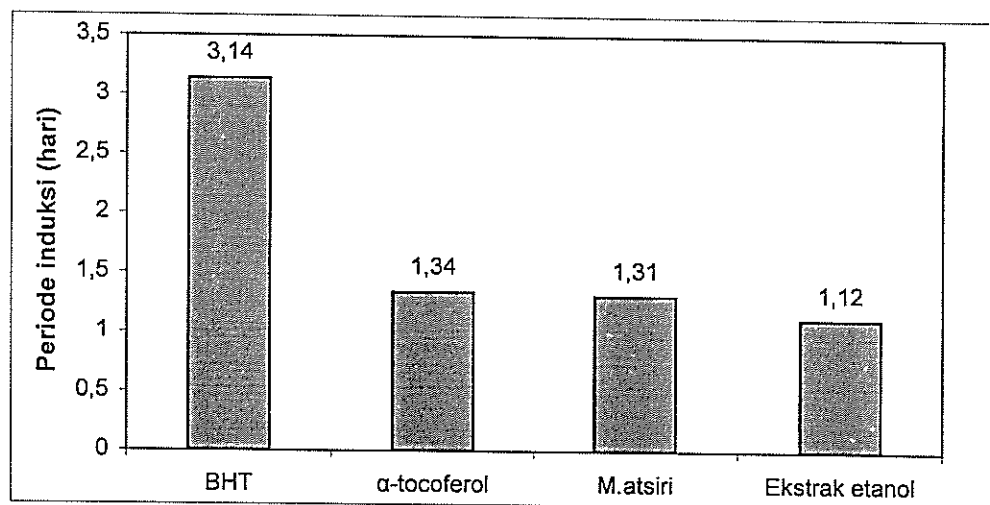
Pada pengujian ini, sampel ekstrak sebanyak 200 ppm ditambahkan pada emulsi asam linoleat. Pembanding yang digunakan yaitu kontrol tanpa penambahan ekstrak, BHT dan  $\alpha$ -tokoferol. Kenaikan bilangan peroksida dari tiap sampel uji dapat dilihat pada Gambar 6. Bilangan peroksida dihitung berdasarkan nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 500 nm sebagai hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode Tiosianat. Nilai absorbansi masing-masing sampel secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2.



Gambar 6. Kurva kenaikan-bilangan peroksida ekstrak rempah *Cinna-Ale*

Pada Gambar 6 dapat dilihat bahwa kurva dari dua jenis antioksidan komersial (BHT dan  $\alpha$ -tocoferol) maupun ekstrak rempah *Cinna-Ale* lebih rendah dari kontrol. Nilai absorbansi kontrol hanya mampu terbaca sampai hari ke-2 penyimpanan. Hal ini disebabkan pada kontrol oksidasi asam linoleat membentuk peroksida berlangsung tanpa hambatan (tidak adanya penambahan antioksidan). Nilai absorbansi yang rendah menunjukkan jumlah peroksida yang rendah pula. BHT memiliki jumlah peroksida yang rendah dibanding  $\alpha$ -tocoferol dan ketiga jenis ekstrak rempah. Hal ini menunjukkan bahwa BHT memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi. BHT merupakan antioksidan sintetis dan digunakan secara luas karena relatif murah. Tetapi masih banyak negara yang tidak mengizinkan penggunaan BHT karena pada percobaan menggunakan binatang, pemberian BHT dalam dosis tinggi menimbulkan efek teratogenik pada tikus (Karyadi, 1997).

Pengukuran aktivitas antioksidan dinyatakan dalam periode induksi. Periode induksi adalah waktu yang diperlukan untuk mencapai nilai ketetapan tertentu. Pada metode Tiosianat, periode induksi adalah waktu yang dibutuhkan untuk mencapai absorbansi 0.3. Menurut Chen *et al.* (1995) nilai absorbansi 0.3 menunjukkan batas jumlah peroksida ketika ekstrak antioksidan sudah tidak mampu lagi menghambat reaksi oksidasi asam linoleat, sehingga asam linoleat dianggap sudah rusak. Periode induksi dapat dihitung dari nilai absorbansi dan lama penyimpanan. Hasil perhitungan periode induksi masing-masing sampel secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 3. Periode induksi rata-rata sampel dapat dilihat pada Gambar 7.

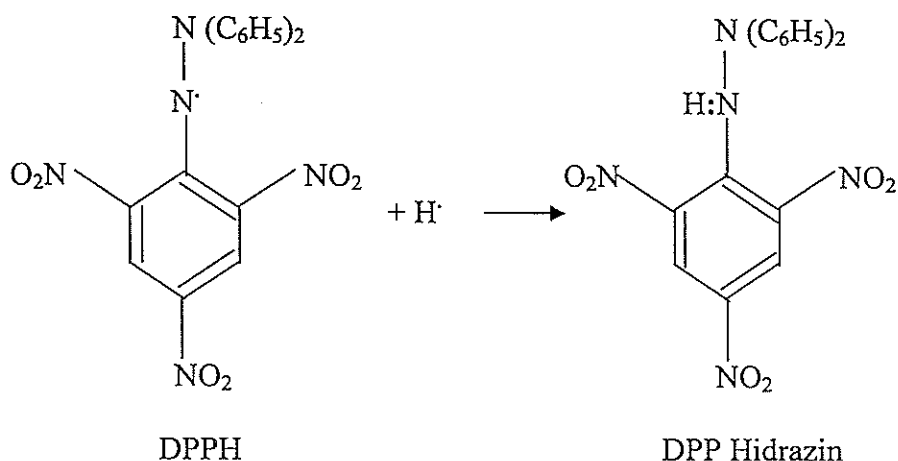


Gambar 7. Histogram periode induksi masing-masing sampel

Periode induksi tertinggi dicapai oleh BHT yaitu 3.14 hari. Sedangkan pembanding lainnya yaitu  $\alpha$ -tocoferol hanya memiliki periode induksi sebesar 1.34 hari. Minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki periode induksi yang tidak jauh berbeda dengan pembanding  $\alpha$ -tocoferol yaitu 1.31 hari. Ekstrak etanol memiliki periode induksi paling rendah yaitu 1.12 hari. Ekstrak heksan tidak dapat dihitung periode induksinya karena bernilai negatif. Data periode induksi tersebut memberikan kesimpulan bahwa aktivitas antioksidan minyak atsiri *Cinna-Ale* tidak jauh berbeda dengan antioksidan komersial  $\alpha$ -tocoferol. Minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki peluang untuk dijadikan sumber antioksidan alami.

### C. PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE DPPH (Hatano *et al.*, 1988)

Pengukuran aktivitas antioksidan selain dilakukan dengan metode Tiosianat juga dengan metode *Scavenging Effect on DPPH Radical* (efek peredaman terhadap radikal bebas DPPH). DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazil) merupakan senyawa radikal bebas yang stabil. Senyawa ini jika disimpan dalam keadaan kering dan kondisi penyimpanan yang baik akan tetap stabil selama bertahun-tahun (Larson, 1997). Reaksi antara DPPH dengan senyawa peredam radikal bebas dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi antara DPPH dengan  $\text{H}^\bullet$  yang berasal dari senyawa peredam radikal bebas

$\text{H}^\bullet$  adalah atom hidrogen yang mengandung satu proton dan satu elektron yang merupakan contoh paling sederhana dari radikal bebas, dan dalam hal ini berasal dari senyawa peredam radikal bebas. Terjadinya reaksi diatas menyebabkan radikal bebas DPPH menjadi DPP Hidrazin yang stabil. Sebaliknya, peredam radikal bebas yang kehilangan  $\text{H}^\bullet$  akan menjadi radikal baru yang reaktif. Banyak senyawa yang mampu meredam radikal bebas, tetapi suatu senyawa dapat digunakan sebagai peredam radikal bebas yang bermanfaat jika setelah bereaksi dengan radikal bebas akan menghasilkan radikal baru yang stabil atau senyawa bukan radikal. Pada radikal bebas,

stabilitasnya dapat disebabkan oleh pengaruh resonansi, halangan ruang maupun oleh besarnya molekul (Larson, 1997).

Pada pengujian dengan metode ini digunakan pembanding BHT dan  $\alpha$ -tocoferol. Ekstrak rempah yang diuji hanya minyak atsiri dan ekstrak etanol karena dari pengujian dengan metode Tiosianat ekstrak heksan tidak memiliki aktivitas antioksidan. Pengukuran dilakukan pada berbagai konsentrasi yaitu 10, 50, 100 dan 200 ppm. Persamaan regresi hasil pengukuran absorbansi masing-masing konsentrasi dihitung, dan kemudian dari persamaan tersebut dihitung nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ ) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50 %. Nilai  $IC_{50}$  menyatakan besarnya daya meredam radikal bebas larutan ekstrak dan dapat digunakan untuk membandingkan daya meredam radikal bebas diantara senyawa-senyawa peredam radikal bebas. Nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 2. Persamaan regresi dan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel pada setiap jam uji dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 2. Nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel pada tiap jam uji

Sampel	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) jam ke-				
	0	1	2	3	4
<b>BHT</b>	34.658	32.557	34.066	31.125	30.054
<b><math>\alpha</math>-tocoferol</b>	34.124	34.536	33.954	29.518	28.732
<b>Minyak atsiri</b>	58.161	53.806	48.944	43.198	42.547
<b>Ekstrak Etanol</b>	174.505	159.176	145.278	130.783	126.900

Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50, kuat untuk  $IC_{50}$  bernilai 50 – 100, sedang jika  $IC_{50}$  bernilai 100 – 150, dan lemah jika  $IC_{50}$  bernilai 151 – 200. Pada Tabel 2 dapat dilihat pembanding BHT dan  $\alpha$ -tocoferol memiliki nilai  $IC_{50}$  yang fluktuatif tetapi keduanya memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat selama 4 jam pengukuran. Sampel ekstrak minyak atsiri pada pengukuran jam ke-0



memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai  $IC_{50}$  58.161  $\mu\text{g/ml}$ . Aktivitasnya semakin meningkat sampai pengukuran jam ke-4 sehingga menyebabkan ekstrak ini termasuk dalam senyawa dengan aktivitas antioksidan sangat kuat ( $IC_{50}$  42.547  $\mu\text{g/ml}$ ). Sampel ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan lemah pada pengukuran jam ke-0 dengan nilai  $IC_{50}$  174.505  $\mu\text{g/ml}$ . Aktivitasnya meningkat selama 4 jam pengukuran berikutnya sehingga ekstrak ini termasuk senyawa dengan aktivitas antioksidan sedang ( $IC_{50}$  126.900  $\mu\text{g/ml}$ ).

Pada Tabel 2 juga dapat dilihat bahwa nilai  $IC_{50}$  sampel minyak atsiri dan ekstrak etanol semakin menurun selama perendaman dan memiliki nilai  $IC_{50}$  paling rendah pada pengukuran jam ke-4. Hal ini dapat disebabkan kelarutan ekstrak dalam metanol yang semakin besar sehingga komponen antioksidan terlarut dan bereaksi optimum dengan radikal bebas DPPH. Selain itu menurut Awika *et al.* (2003) beberapa antioksidan fenolik bereaksi lambat dengan DPPH dan mencapai kondisi stabil setelah satu jam atau lebih. Oleh karena itu pengukuran aktivitas antioksidan harus dilakukan selama beberapa jam dan berulang. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode Peredam Radikal Bebas DPPH memberikan kesimpulan hasil yang sama dengan metode Tiosianat yaitu aktivitas antioksidan minyak atsiri *Cinna-Ale* cukup kuat dan berpotensi sebagai sumber antioksidan alami.

#### **D. AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK REMPAH CINNA-ALE**

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode Difusi Sumur. Pada metode Difusi Sumur, pertumbuhan bakteri pada agar dihambat oleh antibakteri yang ada dalam sumur sehingga dibutuhkan suatu jumlah antibakteri yang relatif sedikit dan mempunyai aktivitas yang besar agar pengaruh penghambatannya dapat terlihat dengan jelas. Metode ini memerlukan waktu lebih singkat dibanding metode hitungan cawan, dan pengujian hanya secara kualitatif, yaitu mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antibakteri ekstrak rempah *Cinna-Ale*. Pengujian dengan metode Difusi Sumur dipengaruhi oleh jenis dan ukuran cawan atau sumur, jenis, pH, dan konsentrasi garam dari larutan pembawa komponen antibakteri,

kemampuan antibakteri untuk berdifusi ke dalam agar, dan mikroorganisme uji (Branen dan Davidson, 1993).

Pengujian dilakukan pada konsentrasi ekstrak rempah 4 % (w/v) dengan menggunakan pelarut DMSO (dimetil sulfoksida). Pemilihan DMSO sebagai pelarut berdasarkan asumsi bahwa DMSO memiliki gugus polar dan non polar yang diharapkan mampu berdifusi pada media pertumbuhan *Nutrient Agar* (NA) untuk membawa komponen antibakteri yang terdapat pada ekstrak rempah *Cinna-Ale*. Oleh karena itu pengaruh DMSO terhadap bakteri uji perlu diteliti sebagai kontrol negatif. Perlakuan kontrol negatif dilakukan dengan menambahkan pelarut DMSO dalam jumlah yang sama dengan ekstrak ke dalam lubang sumur. Hasil pengamatan pengaruh DMSO terhadap bakteri uji tidak menunjukkan daya hambat sehingga dapat diabaikan.

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotika (*amoxycillin*) yang dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 0.05 % (w/v). Penggunaan *amoxycillin* bertujuan untuk membandingkan seberapa besar aktivitas antibakteri ekstrak rempah *Cinna-Ale* dibandingkan dengan antibiotika sintetis. Hasil pengamatan menunjukkan *amoxycillin* memiliki spektrum yang luas karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif. Hasil aktivitas antibakteri ekstrak rempah *Cinna-Ale* dapat dilihat pada Tabel 3 dan perhitungan diameter penghambatannya dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 3. Aktivitas antibakteri ekstrak rempah *Cinna-Ale*

Sampel	Bakteri uji	Ekstrak 4 % (w/v)	<i>Amoxycillin</i> 0.05 % (w/v)
		Mm	mm
Minyak atsiri	<i>S. aureus</i>	4.77	11.45
	<i>E. coli</i>	3.34	13.68
	<i>S. Typhimurium</i>	5.37	20.68
	<i>P. aeruginosa</i>	0	8.28
Ekstrak heksan	<i>S. aureus</i>	0	7.57
	<i>E. coli</i>	0	11.70
	<i>S. Typhimurium</i>	0	18.65

	<i>P. aeruginosa</i>	0	6.10
Ekstrak etanol	<i>S. aureus</i>	0	9.33
	<i>E. coli</i>	0	11.90
	<i>S. Typhimurium</i>	0	23.70
	<i>P. aeruginosa</i>	1.08	8.03

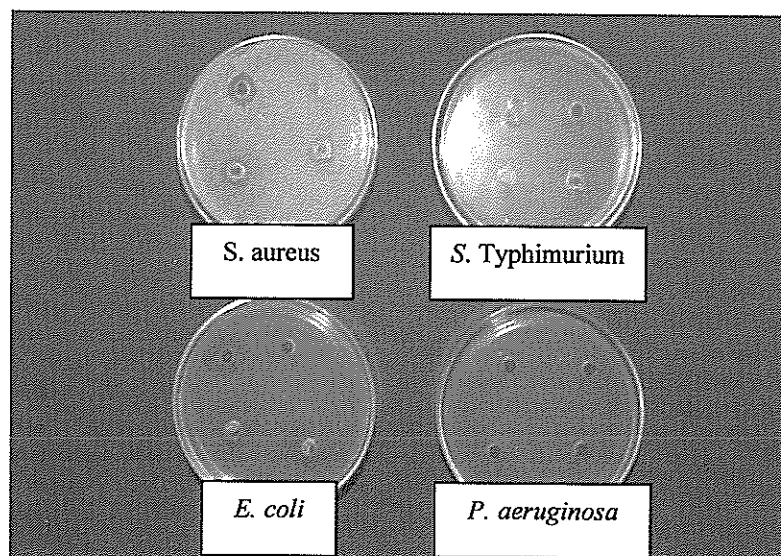
## 1. Minyak Atsiri

Mekanisme antibakteri dari minyak atsiri rempah disebabkan senyawa terpen yang terkandung didalamnya. Sebagian besar terpen aktif, seperti eugenol, thymol dan carvacrol, adalah komponen fenolik di alam. Oleh karena itu, sangat beralasan jika daya antibakteri dari minyak atsiri dihubungkan dengan keberadaan komponen fenolik. Secara umum, cara kerja dari komponen fenolik adalah merusak fungsi dari membran sitoplasma mikroorganisme (Davidson dan Naidu, 2000). Komponen fenolik merupakan antimikroba terbesar yang terdapat pada minyak atsiri rempah (Robinson *et al.*, 2000). Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa minyak atsiri mampu menghambat hampir seluruh bakteri uji kecuali *Pseudomonas aeruginosa*.

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap minyak atsiri rempah *Cinna-Ale* mampu menghambat bakteri Gram negatif *E. coli* dengan diameter penghambatan 3.34 mm dan *S. Typhimurium* dengan diameter penghambatan 5.37 mm. Selain menghambat bakteri Gram negatif, minyak atsiri juga mampu menghambat bakteri Gram positif *S. aureus* dengan diameter penghambatan 4.77 mm. Penghambatan yang paling tinggi pada bakteri Gram negatif *S. Typhimurium*. Gambar uji Difusi Sumur ekstrak minyak atsiri dapat dilihat pada Gambar 9.

Komponen fenolik minyak atsiri tidak hanya menyerang membran sitoplasma, merusak permeabilitasnya dan menyebabkan keluarnya komponen intraseluler, tetapi juga menyebabkan disfungsi membran dalam hal transport elektron, pengambilan nutrisi, sintesis asam nukleat dan aktifitas ATPase (Robinson *et al.*, 2000). Komponen aktif minyak atsiri *Cinna-Ale* diantaranya adalah trans-caryophyllene, eugenol,

myristicin,  $\alpha$ -terpinene, 1,8-cineol, terpineol, Z-citral, geranial, 3-carene, 1-limonene dan  $\alpha$ -pinene (Yasni, 2001).



Gambar 9. Uji Difusi Sumur ekstrak minyak atsiri

Minyak atsiri rempah memiliki sifat bakterisidal terhadap bakteri Gram positif tetapi bersifat bakteristatik terhadap bakteri Gram negatif (Robinson *et al.*, 2000). Gugus hydroxyl (-OH) pada fenolik dapat membentuk ikatan hidrogen dengan sisi aktif enzim sel mikroba sehingga menyebabkan deaktivasi enzim (Hirasa dan Takemasa, 1998).

*Pseudomonas aeruginosa* lebih resisten terhadap komponen antibakteri minyak atsiri *Cinna-Ale*. *P. aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif yang mempunyai struktur dinding sel terdiri dari 5 – 20 % peptidoglikan serta kandungan protein, lipopolisakarida dan lipoprotein yang berlapis-lapis sehingga *P. aeruginosa* lebih tahan terhadap perubahan lingkungan yang disebabkan oleh bahan kimia. Menurut Robinson *et al.* (2000), *P. aeruginosa* memproduksi berbagai jenis enzim ekstraseluler yang dapat membuatnya resisten terhadap senyawa antimikroba.

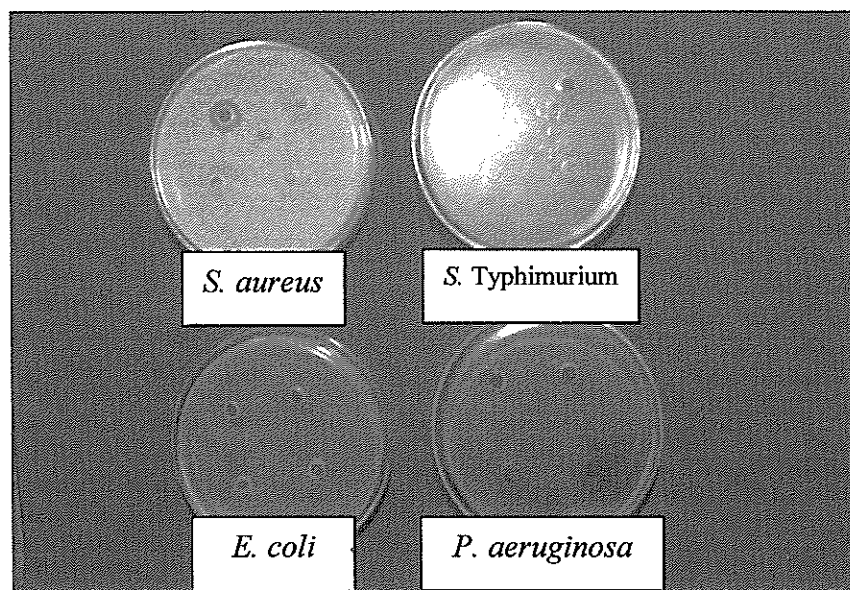
Kontrol positif (*amoxycillin*) memiliki diameter penghambatan paling besar pada bakteri Gram negatif *S. Typhimurium* yaitu 20.68 mm. Pada Tabel 3 juga dapat dilihat bahwa *amoxycillin* dengan konsentrasi hampir

100 kali lebih kecil dibanding ekstrak minyak atsiri memiliki aktivitas antibakteri 3 sampai 4 kali lebih besar. Menurut Jay (2000), antibiotika adalah metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroorganisme, dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme lainnya dengan spektrum luas. Sebagian besar antibiotika menghambat sintesis protein dengan cara mempengaruhi fungsi ribosom. Antibiotika bekerja secara spesifik, artinya hanya bereaksi terhadap jenis mikroba tertentu tanpa mempengaruhi jenis lainnya. Sensitivitas mikroorganisme terhadap antibiotika bervariasi. Hasil pengujian ini juga menunjukkan bahwa sifat antibakteri minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki spektrum luas karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif.

## 2. Ekstrak Heksan

Ekstrak non polar diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut heksan. Komponen antibakteri yang bersifat non polar diharapkan dapat larut dalam pelarut heksan. Ekstrak heksan *Cinna-Ale* tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap semua bakteri uji (*S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* dan *P. aeruginosa*), seperti yang terlihat pada Tabel 3. Gambar uji Difusi Sumur ekstrak heksan dapat dilihat pada Gambar 10.

Proses difusi yang terganggu mengakibatkan daya penghambatannya tidak terdeteksi. Aktivitas antibakteri yang optimum sangat ditentukan oleh keseimbangan hidrofilik-lipofilik. Sifat hidrofilik dibutuhkan agar antibakteri dapat larut dalam air sebagai tempat tumbuh mikroorganisme, sedangkan karakteristik lipofilik diperlukan agar zat tersebut dapat bereaksi dengan membran dari mikroorganisme (Branen dan Davidson, 1993). Ekstrak heksan hanya memiliki sifat lipofilik sehingga tidak tercampur dalam medium tempat tumbuh bakteri.



Gambar 10. Uji Difusi Sumur ekstrak heksan

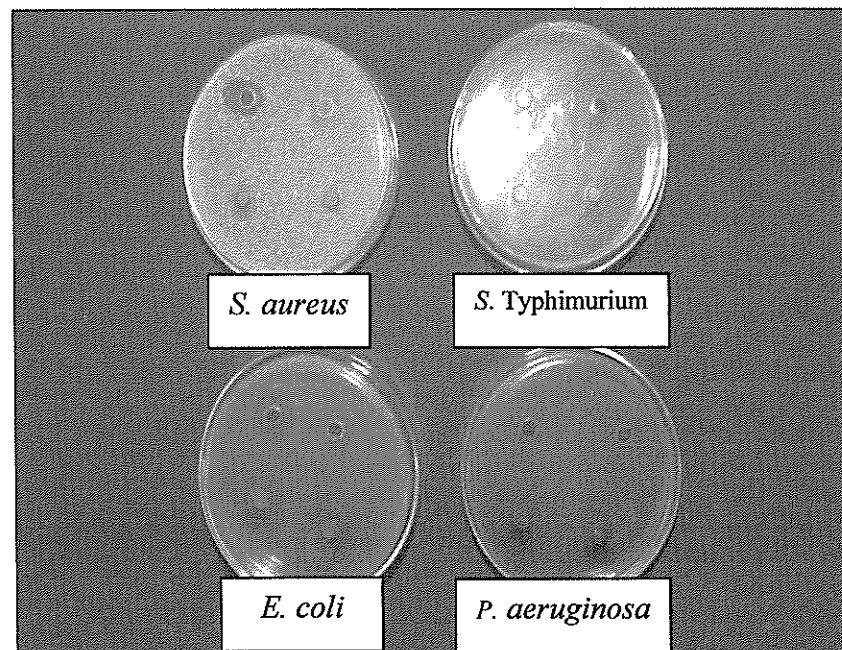
Heksan dapat melarutkan lilin, lemak dan minyak atsiri. Pada penelitian ini minyak atsiri telah diekstrak terlebih dahulu dengan metode Distilasi Uap sehingga yang tertinggal pada ekstrak heksan hanya lilin dan lemak. Lilin terdiri dari campuran asam lemak, alkohol rantai panjang, ester dan parafin. Tidak adanya daya hambat dari ekstrak heksan dapat juga disebabkan jumlah antibakteri pada ekstrak tersebut sangat sedikit atau bahkan tidak ada.

### 3. Ekstrak Etanol

Ekstrak polar dari penelitian ini diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut etanol. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol hanya mampu menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* dengan diameter penghambatan sangat kecil, yaitu 1.08 mm. Mekanisme penghambatan komponen alami tumbuhan terutama terhadap *Pseudomonas aeruginosa* adalah dengan cara bereaksi dengan komponen fosfolipida dari membran sel yang meningkatkan permeabilitas dan menyebabkan sel mengalami pembengkakan, sehingga komponen intraseluler keluar dan sel akan mati (Branen dan Davidson, 1993).

Kecilnya daya hambat ekstrak etanol terhadap bakteri uji dapat disebabkan jumlah zat antibakteri yang sangat sedikit sehingga tidak

cukup kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri. *Amoxycillin* dengan konsentrasi hampir 100 kali lebih kecil dibanding ekstrak etanol mempunyai aktivitas antibakteri 8 kali lebih besar. Kontrol positif *amoxycillin* memiliki daya hambat paling besar terhadap *S. Typhimurium* (23.70 mm). Gambar uji Difusi Sumur ekstrak etanol dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Uji Difusi Sumur ekstrak etanol

## E. KONSENTRASI MINIMUM PENGHAMBATAN (MIC)

Setelah diketahui bahwa ekstrak rempah *Cinna-Ale* mempunyai aktivitas antibakteri maka penelitian dilanjutkan dengan penentuan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). MIC adalah konsentrasi terendah dari komponen antibakteri, yang pada kondisi tersebut tidak terjadi pertumbuhan bakteri selama masa inkubasi 24 jam. MIC dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jumlah inokulum, komposisi medium, waktu inkubasi, kondisi inkubasi seperti suhu, pH, dan potensial redoks, dan kemurnian bakteri uji. Pada penentuan MIC ekstrak rempah *Cinna-Ale*, antibakteri ditempatkan pada agar, dan bakteri uji digoreskan di atasnya. Pengujian dilakukan dengan kisaran konsentrasi ekstrak 0, 5, 10, 15, 20 dan 25 mg/ml. Bakteri yang diuji

hanya bakteri yang mempunyai diameter penghambatan paling besar pada masing-masing ekstrak. Setelah diperoleh konsentrasi minimum penghambatan ekstrak kemudian pengujian dilanjutkan dengan mempersempit selang konsentrasi menjadi 0.5 mg/ml.

Minyak atsiri yang memberikan daya penghambatan paling besar terhadap bakteri Gram negatif *S. Typhimurium* memiliki nilai MIC 2 mg/ml (0.2 % w/v). Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi minyak atsiri *Cinna-Ale* 2 mg/ml mampu menghambat pertumbuhan *S. Typhimurium*. Pengujian juga dilakukan terhadap bakteri Gram positif *S. aureus* dengan ekstrak minyak atsiri dan memberikan nilai MIC 0.5 mg/ml (0.05 % w/v). *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang relatif peka terhadap zat antibakteri sehingga pada konsentrasi minyak atsiri 0.5 mg/ml pertumbuhannya sudah terhambat. Pada ekstrak heksan tidak dilakukan uji MIC karena tidak adanya daya hambat terhadap seluruh bakteri uji (Tabel 3). Ekstrak etanol yang memberikan penghambatan sangat kecil terhadap *P. aeruginosa*, pada konsentrasi uji 40 mg/ml masih tidak menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* merupakan bakteri yang tahan terhadap ekstrak etanol *Cinna-Ale*. Ketahanan *P. aeruginosa* ini didukung dengan tidak adanya daya hambat dari minyak atsiri dan ekstrak heksan pada uji Difusi Sumur.



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

*Cinna-Ale* adalah minuman fungsional yang memberikan efek positif terhadap kesehatan. Minuman ini terdiri dari 17 jenis rempah yaitu jahe, kayu manis, cabe jawa, secang, lada putih, lada hitam, sereh, daun pandan, kapulaga, kapul kecil, fuli, biji pala, adas manis, jinten hitam, cengkeh, pekak, dan kayu mesoyi. Formula minuman sesuai dengan paten No. P002001 00054. Ekstraksi campuran rempah *Cinna-Ale* menghasilkan tiga jenis ekstrak yaitu minyak atsiri, ekstrak heksan (non polar) dan ekstrak etanol (polar). Rendemen ekstrak paling besar diperoleh dari ekstrak etanol yaitu 8.81 % (w/w). Rendemen minyak atsiri sebesar 1.56 % (w/w) dan rendemen paling rendah adalah ekstrak heksan sebesar 1.39 % (w/w). Tingginya rendemen ekstrak polar menunjukkan komponen rempah-rempah *Cinna-Ale* sebagian besar merupakan senyawa polar (tanin, fenolik dan gula).

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode Tiosianat diperoleh hasil minyak atsiri memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dibandingkan ekstrak heksan dan etanol. Hal ini ditunjukkan dengan nilai periode induksi sebesar 1.31 hari. Nilai ini tidak jauh berbeda dengan periode induksi  $\alpha$ -tocoferol yaitu 1.34 hari.

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode Peredaman Radikal Bebas DPPH menunjukkan bahwa minyak atsiri memiliki nilai  $IC_{50}$  58.161  $\mu\text{g/ml}$  pada pengukuran jam ke-0 dan semakin menurun selama 4 jam pengukuran berikutnya menjadi 42.547  $\mu\text{g/ml}$ . Begitu pula dengan ekstrak etanol memiliki nilai  $IC_{50}$  yang semakin menurun yaitu 174.505  $\mu\text{g/ml}$  pada pengukuran jam ke-0 menjadi 126.900  $\mu\text{g/ml}$  pada pengukuran jam ke-4. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Minyak atsiri termasuk dalam senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat ( $IC_{50}$  kurang dari 50) sedangkan ekstrak etanol termasuk senyawa dengan aktivitas antioksidan sedang ( $IC_{50}$  = 100–150). Hasil ini memberikan kesimpulan bahwa minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki peluang untuk dijadikan sumber antioksidan alami.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Difusi Sumur. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri Gram negatif *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* dan bakteri Gram positif *S. aureus*. Hasil yang diperoleh yaitu minyak atsiri memberikan daya hambat paling besar terhadap bakteri Gram negatif *S. Typhimurium* dengan diameter penghambatan 5.37 mm. Selain menghambat bakteri Gram negatif, minyak atsiri juga mampu menghambat bakteri Gram positif *S. aureus* dengan diameter penghambatan 4.77 mm. Hasil pengujian ini juga menunjukkan bahwa sifat antibakteri minyak atsiri *Cinna-Ale* memiliki spektrum luas karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif.

Ekstrak heksan tidak memberikan daya hambat terhadap pertumbuhan seluruh bakteri uji, dan ekstrak etanol hanya memberikan penghambatan terhadap bakteri Gram negatif *P. aeruginosa* dengan diameter penghambatan 1.08 mm. Pengujian antibakteri dilanjutkan dengan penentuan konsentrasi minimum penghambatan (MIC) ekstrak. Minyak atsiri memiliki nilai MIC 2 mg/ml (0.2 % w/v) untuk bakteri Gram negatif *S. Typhimurium*, dan 0.5 mg/ml (0.05 % w/v) untuk bakteri Gram positif *S. aureus*.

Dari hasil-hasil diatas dapat disimpulkan bahwa ekstrak campuran rempah *Cinna-Ale* memiliki aktivitas antibakteri (terutama terhadap bakteri patogen dan perusak *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* dan *S. aureus*) dan aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Oleh karena itu minuman *Cinna-Ale* berpeluang besar untuk dikembangkan sebagai sumber antioksidan dan antibakteri alami.

## B. SARAN

- Perlu dilakukan ekstraksi dengan metode yang berbeda untuk dapat mengetahui metode yang paling efektif dengan rendemen yang besar, contohnya metode SCFE (*Supercritical Fluid Extraction*).
- Perlu dilakukan pengukuran aktivitas antibakteri dan antioksidan dari minuman *Cinna-Ale* sehingga dapat dibandingkan dengan hasil pengukuran terhadap ekstraknya.

- Aktivitas antioksidan yang kuat dari minyak atsiri *Cinna-Ale* dapat dimanfaatkan untuk mencegah penyakit-penyakit degeneratif. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang khasiat minuman *Cinna-Ale* sebagai antikanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adhiwirawan, A. 2001. Pengaruh Minuman Kesehatan *Cinna-Ale* Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Darah Pada Tikus *Sprague Dawley*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Awika, J. M., L. W. Rooney, X. Wu, R. L. Prior, dan L. C. Zevallos. 2003. Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem.* 51 : 6657 - 6662.
- Branen, A. L. dan Davidson, P. M. 1993. *Antimicrobials in Food*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcell Dekker, New York.
- Caragay, A. B. 1992. Cancer Preventive Foods and Ingredients. *Food Tech.* 46 : 65 – 68.
- 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.
- Chen, H. M., K. Muramoto, F. Yamauchi, dan K. Nokihara. 1996. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on The Antioxidative Peptide Isolated From Digests of A Soybean Protein. *J. Agric. Food Chem.* 44 : 2620.
- Davidson, P. M. dan Naidu, A. S. 2000. Phyto-phenols. Di dalam : Naidu A. S. (ed.). *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, Boca Raton.
- 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.
- Farrel, K. T. 1990. *Spices, Condiment and Seasoning*. 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.
- Gordon, M. H. 1990. The Mechanism of Antioxidant Action in vitro. Di dalam : Hudson, B. J. F. (ed.). *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London. Hal : 1-15.
- Hatano, T., H. Kagawa, 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.

- Hesler, C. M. 1995. Functional Foods : The Western Perspective. First International Conference on East-West Perspective on Functional Foods. Singapore. Sept. 26 – 29.
- Hirasa, K. dan Takemasa, M. 1998. Spice Science and Technology. Marcell Dekker, Inc., New York.
- Houghton, P. J. dan Raman, A. 1998. Laboratory Handbook for The Fractination of Natural Extracts. Thomson Science, London.
- ICMSF (The International Commision on Microbiological Spesifications For Foods). 1996. Microorganisms in Foods 5. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London.
- Jay, J. M. 2000. Modern Food Microbiology, 6<sup>th</sup> ed. Aspen Publ., Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Karyadi, E. 1997. Antioksidan, Resep Sehat dan Umur Panjang. <http://www.indomedia.com/intisari/1997/juni/antioks.htm>. [20 Januari 2004].
- Kochhar, S. P. dan Rossell, J. B. 1990. Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food Systems. Di dalam Hudson, B. J. F. (ed.). Food Antioxidants. Elsevier Applied Science, New York. Hal : 19 – 64.
- Larson, R. A. 1997. Naturally Occuring Antioxidants. Di dalam Windono, T., S. Soediman, U. Yudawati, E. Ermawaty, A. Srielita dan T. I. Erowati. Uji Peredam Radikal Bebas Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazil (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. Artocarpus, Surabaya. Vol. 1 : 34-43.
- Loliger, J. 1993. Natural Antioxidants. Di dalam Allen, J.C. dan Hamilton, R. J. (eds.). Rancidity in Foods. Applied Science Publisher, London. Hal : 89 – 108.
- Nychas, G. J. E. 1995. Natural Antimicrobial from Plants. Di dalam : New Method Food Preservative. Blakie Academic, London.
- Pelczar, M. J., E. C. S. Chan dan N. R. Krieg. 1993. Microbiology Concepts and Application. Mc Graw Hill Book Co., New York.
- Pratt, D.E. dan Hudson, B. J. F. 1990. Natural Antioxidant Not Exploited Commercially. Di dalam Hudson, B.J.F. (ed.). Food Antioxidant. Elsevier Applied Science, New York. Hal : 171 - 192.
- Ray, B. 2001. Fundamental Food Microbiology, 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Reineccius, G. A. 1997. Source Book of Flavors, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman and Hall, New York.
- Robinson, R. K., C. A. Batt, dan P. D. Patel. 2000. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, London.
- Taylor, M. J. dan Richardson, T. 1980. Antioxidant Activity of Cystein and Protein Sulphidrils in Linoleat Emulsion Ovidized by Hemoglobin. J. Food Sci. 45 : 1223.
- Trilaksani, W. 2003. Antioksidan : Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan. Term Paper. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- White, P. J. 1995. Conjugated Diene, Anisidine Value and Carbonyl Value Analysis. Di dalam Warner, K. dan Eskin, N. A. M. (eds.). Methods to Asses Quality and Stability of Oil and Fat Containing Foods. AOAC Press, Champaign.
- Yasni, S. 2001. Khasiat *Cinna-Ale* Sebagai Pencegah Penyakit Degeneratif. Di dalam Nuraida, L. dan Hariyadi, R. D. (eds.). Pangan Tradisional : Basis Bagi Industri Pangan Fungsional dan Suplemen. Hal : 97 – 106. Pusat Kajian Makanan Tradisional, IPB, Bogor.

# LAMPIRAN

Lampiran 1. Data hasil ekstraksi rempah *Cinna-Ale*

	Minyak Atsiri	Ekstrak Heksan	Ekstrak Etanol
Metode ekstraksi	Distilasi uap	Refluks	Refluks
Berat bahan awal	370 g	365.88 g	336.66 g
Berat ekstrak	5.76 g	5.1309 g	32.59 g
Rendemen	1.56 % (w/w)	1.39 % (w/w)	8.81 % (w/w)
Warna	Kuning	Hijau pekat	Coklat
Aroma	Khas rempah	Khas rempah	Menyengat

Contoh perhitungan rendemen :

Minyak atsiri

$$\frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat bahan awal (g)}} \times 100 \% = \frac{5.76}{370} \times 100 \% = 1.56 \%$$



Lampiran 2. Nilai absorbansi masing-masing sampel pada panjang gelombang 500 nm

Perlakuan	Hari ke-				
	0	1	2	3	4
Kontrol	0.320	0.982	1.080	> 2	> 2
	0.332	0.889	1.176		
Rata-rata	<b>0.326</b>	<b>0.936</b>	<b>1.128</b>		
BHT	0.220	0.250	0.254	0.293	0.290
	0.269	0.279	0.326	0.298	0.332
Rata-rata	<b>0.245</b>	<b>0.265</b>	<b>0.290</b>	<b>0.296</b>	<b>0.311</b>
$\alpha$ -tocoferol	0.152	0.271	0.313	0.461	0.803
	0.145	0.230	0.400	0.485	0.645
Rata-rata	<b>0.149</b>	<b>0.251</b>	<b>0.357</b>	<b>0.473</b>	<b>0.724</b>
Minyak Atsiri	0.255	0.270	0.305	0.338	0.500
	0.260	0.266	0.324	0.351	0.564
Rata-rata	<b>0.258</b>	<b>0.268</b>	<b>0.315</b>	<b>0.345</b>	<b>0.532</b>
Heksan	0.348	0.373	0.469	0.489	0.519
	0.375	0.392	0.478	0.513	0.533
Rata-rata	<b>0.362</b>	<b>0.383</b>	<b>0.474</b>	<b>0.501</b>	<b>0.526</b>
Etanol	0.256	0.304	0.311	0.345	0.423
	0.281	0.289	0.329	0.356	0.430
Rata-rata	<b>0.269</b>	<b>0.297</b>	<b>0.320</b>	<b>0.351</b>	<b>0.427</b>

Lampiran 3. Regresi linier dan periode induksi ekstrak

Perlakuan	Regresi linier	Periode induksi
Kontrol	$y = 0.3800 x + 0.3830$	- 0.22
	$y = 0.4220 x + 0.4080$	- 0.26
<b>Rata-rata</b>	<b><math>y = 0.4010 x + 0.3957</math></b>	<b>- 0.24</b>
BHT	$y = 0.0183 x + 0.2248$	4.11
	$y = 0.0145 x + 0.2718$	1.94
<b>Rata-rata</b>	<b><math>y = 0.0163 x + 0.2488</math></b>	<b>3.14</b>
$\alpha$ -tocoferol	$y = 0.1492 x + 0.1016$	1.33
	$y = 0.1255 x + 0.1300$	1.35
<b>Rata-rata</b>	<b><math>y = 0.1372 x + 0.1164</math></b>	<b>1.34</b>
Minyak Atsiri	$y = 0.0558 x + 0.2220$	1.40
	$y = 0.0693 x + 0.2144$	1.24
<b>Rata-rata</b>	<b><math>y = 0.0626 x + 0.2182</math></b>	<b>1.31</b>
Heksan	$y = 0.0458 x + 0.3480$	- 1.05
	$y = 0.0437 x + 0.3708$	- 1.62
<b>Rata-rata</b>	<b><math>y = 0.0448 x + 0.3594</math></b>	<b>- 1.33</b>
Etanol	$y = 0.0375 x + 0.2528$	1.26
	$y = 0.0365 x + 0.2640$	0.99
<b>Rata-rata</b>	<b><math>y = 0.0370 x + 0.2584</math></b>	<b>1.12</b>

Contoh perhitungan periode induksi :

Regresi rata-rata kontrol :  $y = 0.4010 x + 0.3957$   
 $0.3 = 0.4010 x + 0.3957$   
 $x = - 0.24$   
 $x = \text{periode induksi}$

Lampiran 4. Aktivitas antioksidan *Cinna-Ale* metode DPPH

Pada jam ke - 0

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	AS*	Persamaan	IC <sub>50</sub>
<b>BHT</b>	10	1.156	1.112	$y = 30.888 \ln(x) - 59.515$	34.658
	50	0.221	81.095		
	100	0.134	88.537		
	200	0.128	89.050		
<b>α-tocoferol</b>	10	1.088	6.929	$y = 29.742 \ln(x) - 54.705$	34.124
	50	0.328	71.942		
	100	0.102	91.275		
	200	0.112	90.419		
<b>Minyak atsiri 1</b>	10	1.102	5.731	$y = 27.636 \ln(x) - 63.65$	61.09
	50	0.833	28.743		
	100	0.348	70.231		
	200	0.162	86.142		
<b>Minyak atsiri 2</b>	10	1.117	4.448	$y = 28.617 \ln(x) - 64.798$	55.231
	50	0.741	36.612		
	100	0.309	73.567		
	200	0.147	87.425		
<b>Etanol 1</b>	10	1.201	-2.737	$y = 0.319 x - 11.727$	161.81
	50	1.171	-0.171		
	100	0.985	15.740		
	200	0.525	55.090		
<b>Etanol 2</b>	10	1.127	3.593	$y = 0.2937 x - 4.9816$	187.2
	50	1.117	4.448		
	100	0.917	21.557		
	200	0.512	56.202		

\* AS = Persentase penghambatan (inhibisi)

$$AS = (A_b - A) / A_b \times 100 \%$$

$A_b$  = Absorbansi blanko = 1.169

Lampiran 4 (lanjutan)

Pada jam ke - 1

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	AS*	Persamaan	IC <sub>50</sub>
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		
$\alpha$ -tocoferol	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	1.171	-1.649	$y = 31.392 \ln(x) - 77.19$	57.512
	50	0.77	33.160		
	100	0.251	78.212		
	200	0.144	87.500		
Minyak atsiri 2	10	1.147	0.434	$y = 30.566 \ln(x) - 69.63$	50.099
	50	0.617	46.441		
	100	0.236	79.514		
	200	0.141	87.760		
Etanol 1	10	1.182	-2.604	$y = 0.3845 x - 12.316$	162.028
	50	1.136	1.389		
	100	0.884	23.264		
	200	0.379	67.101		
Etanol 2	10	1.178	-2.257	$y = 0.3851 x - 10.2$	156.323
	50	1.082	6.076		
	100	0.864	25.000		
	200	0.357	69.010		

\* Ab = 1.152

Lampiran 4 (lanjutan)

Pada jam ke - 2

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	AS*	Persamaan	IC <sub>50</sub>
BHT	10	1.172	-0.601	$y = 30.954 \ln(x) - 59.217$	34.066
	50	0.156	86.609		
	100	0.133	88.584		
	200	0.146	87.468		
$\alpha$ -tocoferol	10	1.067	8.412	$y = 28.671 \ln(x) - 51.067$	33.954
	50	0.339	70.901		
	100	0.121	89.614		
	200	0.129	88.927		
Minyak atsiri 1	10	1.174	-0.773	$y = 32.074 \ln(x) - 76.796$	52.274
	50	0.72	38.197		
	100	0.204	82.489		
	200	0.118	89.871		
Minyak atsiri 2	10	1.153	1.030	$y = 31.277 \ln(x) - 69.485$	45.613
	50	0.566	51.416		
	100	0.187	83.948		
	200	0.119	89.785		
Etanol 1	10	1.204	-3.348	$y = 0.4208 x - 11.668$	146.549
	50	1.107	4.979		
	100	0.825	29.185		
	200	0.303	73.991		
Etanol 2	10	1.184	-1.631	$y = 0.4156 x - 9.8491$	144.006
	50	1.078	7.468		
	100	0.825	29.185		
	200	0.289	75.193		

\* Ab = 1.165

Lampiran 4 (lanjutan)

Pada jam ke - 3

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	AS*	Persamaan	IC <sub>50</sub>
<b>BHT</b>	10	1.202	2.986	$y = 30.497 \ln(x) - 54.848$	31.125
	50	0.139	88.781		
	100	0.118	90.476		
	200	0.125	89.911		
<b>α-tocoferol</b>	10	1.058	14.609	$y = 27.113 \ln(x) - 41.779$	29.518
	50	0.333	73.123		
	100	0.105	91.525		
	200	0.116	90.638		
<b>Minyak atsiri 1</b>	10	1.164	6.053	$y = 29.803 \ln(x) - 63.958$	45.787
	50	0.693	44.068		
	100	0.193	84.423		
	200	0.124	89.992		
<b>Minyak atsiri 2</b>	10	1.164	6.053	$y = 29.66 \ln(x) - 59.849$	40.609
	50	0.535	56.820		
	100	0.176	85.795		
	200	0.124	89.992		
<b>Etanol 1</b>	10	1.178	4.923	$y = 0.4081 x - 4.3683$	133.223
	50	1.113	10.169		
	100	0.801	35.351		
	200	0.26	79.015		
<b>Etanol 2</b>	10	1.169	5.650	$y = 0.3988 x - 1.1827$	128.342
	50	1.041	15.981		
	100	0.775	37.450		
	200	0.251	79.742		

\* Ab = 1.239

Lampiran 4 (lanjutan)

Pada jam ke - 4

Sampel	Konsentrasi (ppm)	A	AS*	Persamaan	IC <sub>50</sub>
<b>BHT</b>	10	1.121	6.427	$y = 28.797 \ln(x) - 47.989$	30.054
	50	0.145	87.896		
	100	0.125	89.566		
	200	0.14	88.314		
<b>α-tocoferol</b>	10	0.988	17.529	$y = 25.744 \ln(x) - 36.458$	28.732
	50	0.342	71.452		
	100	0.113	90.568		
	200	0.125	89.566		
<b>Minyak atsiri 1</b>	10	1.134	5.342	$y = 29.85 \ln(x) - 64.377$	46.154
	50	0.662	44.741		
	100	0.19	84.140		
	200	0.127	89.399		
<b>Minyak atsiri 2</b>	10	1.105	7.763	$y = 28.858 \ln(x) - 55.664$	38.939
	50	0.488	59.265		
	100	0.165	86.227		
	200	0.129	89.232		
<b>Etanol 1</b>	10	1.146	4.341	$y = 0.4171 x - 3.5879$	128.48
	50	1.061	11.436		
	100	0.722	39.733		
	200	0.236	80.301		
<b>Etanol 2</b>	10	1.137	5.092	$y = 0.4153 x - 2.0432$	125.32
	50	1.007	15.943		
	100	0.743	37.980		
	200	0.212	82.304		

\* Ab = 1.198

Lampiran 5. Perhitungan diameter penghambatan bakteri metode Difusi Sumur

Sampel	Bakteri uji	Ekstrak 4 % (w/v)			Amoxycillin 0.05 % (w/v)	
		mm	mm/gr ekstrak	mm/gr bahan	mm	mm/gr ekstrak
Minyak atsiri	<i>S.aureus</i>	4.77	1987.50	30.94	11.45	381666.67
	<i>E.coli</i>	3.34	1391.67	21.66	13.68	456000.00
	<i>S. Typhimurium</i>	5.37	2237.50	34.83	20.68	689333.33
	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	8.28	276000.00
Ekstrak heksan	<i>S.aureus</i>	0	0	0	7.57	252333.33
	<i>E.coli</i>	0	0	0	11.70	390000.00
	<i>S. Typhimurium</i>	0	0	0	18.65	621666.67
	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	6.10	203333.33
Ekstrak etanol	<i>S.aureus</i>	0	0	0	9.33	311000.00
	<i>E.coli</i>	0	0	0	11.90	396666.67
	<i>S. Typhimurium</i>	0	0	0	23.70	790000.00
	<i>P. aeruginosa</i>	1.08	450.00	39.64	8.03	267666.67

Contoh perhitungan :

Ekstrak = minyak atsiri 4 % (w/v) = 4 g / 100 ml = 0.04 g / ml

Bakteri uji = *S. aureus*

mm/gr ekstrak =

$$\frac{\text{Volume ekstrak } (\mu\text{l})}{\text{Volume uji } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{Diameter penghambatan (mm)}}{\text{Bobot ekstrak uji (g)}}$$

$$\frac{1000 \mu\text{l}}{60 \mu\text{l}} \times \frac{4.77 \text{ mm}}{0.04 \text{ g}}$$

$$= 1987.50 \text{ mm/gr ekstrak}$$

mm/gr bahan =

$$\frac{\text{Volume ekstrak } (\mu\text{l})}{\text{Volume uji } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{d.p (mm)}}{\text{Bobot ekstrak uji (g)}} \times \frac{\text{Bobot total ekstrak (g)}}{\text{Bobot bahan awal (g)}}$$

$$\frac{1000 \mu\text{l}}{60 \mu\text{l}} \times \frac{4.77 \text{ mm}}{0.04 \text{ g}} \times \frac{5.76 \text{ g}}{370 \text{ g}}$$

$$= 30.94 \text{ mm/gr bahan}$$