

Pengaruh Waktu Dan Suhu Ekstraksi Daun Melinjo (*Gnetum Gnenom L.*) terhadap Aktivitas Antioksidan

Windi Susmayanti^{1*}, Dwi Endah Kusumawati²

ABSTRACT

Background: The widely cultivated melinjo leaf, or *Gnetum L genome*, is the most valuable commodities cause it contains phenolic chemicals that have antioxidant properties. It is possible to get phenolic chemicals from melinjo leaves by macerating them in ethanol, typically at room temperature. By raising the temperature and length of the extraction process, the yield-maximizing extraction process can be hastened. **Methods:** The objective of this study is to ascertain the antioxidant activity of melinjo leaves that have been ethanol extracted at 45, 60, and 75 °C. For each temperature change, extraction was done using 96% ethanol (1:10, w/v) for 30 and 45 minutes. The yield, phytochemical assay, total phenolic, and antioxidant activity using the The CUPRAC technique is the variables tested in this study. **Results:** According to research findings, temperature and extraction time have an impact on yield, content phenolic total, and antioxidant activity. An extract with the maximum antioxidant activity and the consistent phenol content 105.97±5.53 mg GAE/ml and Ic_{50} of 59.7953 was produced after 45 minutes of extraction at 60°C, but the yield was only 2.22%.

Keywords: antioxidant, cupric, extraction, melinjo, phenolic

PENDAHULUAN

Melinjo (*Gnetum genom L*) merupakan salah sumber tanaman yang bermanfaat sebagai antioksidan alami. Melinjo dimanfaatkan sebagai bahan obat herbal tradisional penyakit kardiovaskuler dan kanker, seringkali digunakan sebagai peningkatan daya tahan tubuh⁽¹⁾. Melinjo (*Gnetum gnenom L*) tergolong dari family *Gnetaceae* yang penyebarannya di Asia tenggara pada wilayah Indonesia yang banyak dibudidayakan dan menjadi salah satu komoditi local yang belum banyak pemanfaatan hanya terbatas sebagai sayur dan pembuatan emping⁽²⁾. Upaya pemanfaatan melinjo sebagai alternative pengobatan tradisional khususnya bagian daun melinjo seperti mengobati luka gigitan anjing, penyakit mata, busung lapar, penyakit mata, dan anemia. Selain itu, yang berhubungan dengan efek farmakologis berdasarkan

penelitian aktivitas daun melinjo sebagai antihiperlikemia untuk menurunkan gula darah⁽³⁾. Efek farmakologis tersebut berasal dari kandungan senyawa metabolite skunder yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan tinggi untuk mengurangi radikal bebas yang menyebabkan berbagai penyakit⁽⁴⁾. Kandungan senyawa metabolit skunder pada daun melinjo yang bersifat antioksidan antara lain flavonoid⁽¹⁾, fenolik, polifenol, alkaloid, steroid dan tannin⁽⁵⁾. Aktivitas antioksidan setara dengan kandungan vitamin c⁽²⁾, antioksidan sintetik *Butylated Hydroxytoluene (BHT)*⁽⁶⁾ yang bersifat karsinogenik⁽²⁾. Daun melinjo (*Gnetum genom L.*) kebanyakan mengandung senyawa flavonoid (>15%)⁽¹⁾, fenol total 0,187 mg/ml pada suhu 60°C dengan pelarut air yang menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi daripada biji dan kulit. Selain itu, kandungan polifenol resveratrol yang memiliki aktivitas antibakteri dan

*Correspondence: Windisusmayanti@unissula.ac.id

¹Departemen Kimia, Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran Unissula

antioksidan yang berperan menghambat *off flavor* sebagai pengawet dan meningkatkan citarasa makanan.

Salah satu faktor yang mempengaruhi kandungan senyawa metabolit yang bersifat antioksidan dapat dihasilkan adalah proses ekstraksi. Proses ekstraksi juga dipengaruhi oleh pelarut, suhu dan waktu⁽²⁾. Penelitian Dewi *et al* (2012) ekstrak melinjo sampel biji, daun dan kulit melalui proses ekstraksi dengan pelarut air suhu 30°, 45°, 60° C selama 10-30 menit menunjukkan bahwa kadar fenol, aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH yang optimum pada 60°C selama 30 menit karena meningkatkan pengikatan senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan dalam pelarut air sehingga aktivitas juga semakin tinggi. Dari ketiga sampel (biji, daun dan kulit), sampel daun menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling tinggi⁽²⁾. Koefisien difusi dan kelarutan komponen fenolik akan meningkat karena peningkatan suhu saat proses ekstraksi. Penggunaan suhu ideal 30-60°C selama proses ekstraksi, hal ini dikarenakan antioksidan rentan terhadap panas⁽⁷⁾. Metode antioksidan yang digunakan selain DPPH belum pernah dilaporkan sehingga akan membandingkan pengaruh variasi suhu dan waktu terhadap aktivitas antioksidan yang menggunakan metode CUPRAC.

Penelitian ini, ekstraksi daun melinjo (*Gnetum gnemon L*) menggunakan pelarut etanol 96% dengan variasi suhu (45,60 dan 75°C) selama 30 dan 45 menit terhadap pengukuran kadar fenol total dengan metode folin Ciocalteu dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun melinjo menggunakan metode CUPRAC.

METODE

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan antara lain bagian daun melinjo yang diperoleh dari desa

welahan, Jepara. Daun yang masih berwarna hijau. Bahan-bahan lain untuk tahap selanjutnya antara lain Aquadest, folin Ciocalteu (Merck), Fenol murni (Merck), Buffer Amonium asetat (Merck), CuCl₂.2H₂ (Merck), etanol 96% teknis, reagen dragendrof, CHCl₃, H₂SO₄, NaOH, FeCl₃, NaCl.

Alat yang digunakan adalah alat setrifugasi, hotplate, thermometer, stirrer, dan blender, Spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu), kuvet disposable, corong Buchner, timbangan analitik, ayakan, waterbath, alat-alat gelas.

Ekstraksi Melinjo

Daun melinjo (*Gnetum gnemon L.*) berasal dari Kabupaten Jepara, dan analisisnya dilakukan di Universitas Diponegoro Program Studi Biologi FMIPA Semarang. Daun melinjo segar dikeringkan di udara, dikeringkan dengan suhu 50°C selama 1 jam, kemudian digiling menjadi bubuk, kemudian diayak dengan ayakan 100 mesh.

Daun melinjo diekstraksi pelarut etanol 96% dilakukan bersamaan pemanasan dengan cara merendam sampel dan pengadukan stirrer kecepatan 150 rpm yang diletakkan diatas hotplate⁽⁸⁾. Perbandingan bahan dan pelarut 1: 10 (b/v) dengan variasi suhu 45,60 dan 75°C dan setelah mencapai ketiga variasi suhu tersebut kemudian suhu dipertahankan selama 30 dan 45 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang dan dilakukan satu kali penyaringan dengan kertas saring. Ekstrak etanol daun melinjo dilakukan sentrifugasi 5000rpm selama 30 menit⁽⁸⁾. Ekstrak dilakukan pengujian total fenol dan aktioksidan.

Pengujian Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan

Ekstrak etanol daun melinjo dilakukan pengujian total fenol menggunakan metode Folin Ciocalteu⁽⁹⁾ dan aktivitas antioksidan menggunakan metode CUPRAC⁽¹⁰⁾.

Pengukuran fenolik total ekstrak dilakukan dengan cara menambahkan reagen Folin-ciocalteau sebanyak 0,5 ml pada 0,1 ml ekstrak etanol daun melinjo (*Gnetum genom L*) dan didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambahkan 0,4 ml Na₂CO₃ 7,5 % lalu dikocok hingga homogen. Campuran tersebut diencerkan dengan aquadest mencapai volume 10 ml dan dibiarkan sampai suhu ruang selama 30 menit selanjutnya dilakukan pengukuran serapan panjang gelombang sebesar 744,8 nm. Hal ini juga dilakukan pada asam galat dengan konsentrasi 2,4,6,8 dan 10 ppm bertujuan untuk mencari kadar fenolik dari kurva standar. Kurva kalibrasi dibuat dari korelasi antara absorbansi dengan konsentrasi asam galat. Oleh karena itu, kadar fenolik yang terkandung dalam ekstrak dinyatakan ekuivalen asam galat (Galic Acid Equivalent). Perhitungan total mengacu pada rumus sebagai berikut:

$$\text{Total fenolik GAE} = \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ GAE} \right) = C. \left(\frac{v}{m} \right)$$

Keterangan :

c = kadar total fenolik dari kurva standard (mg/L)

v = banyaknya ekstrak yang digunakan (L)

m = berat ekstrak (g)

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol daun melinjo (*Gnetum genom L*) untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit terutama senyawa fenolik dan senyawa yang berperan sebagai antioksidan seperti flavonoid, polifenol, tannin, saponin, triterpenoid

Aktivitas Antioksidan dengan Metode Cuprac

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol menggunakan metode *Cuprac* dengan langkah membuat reagen *cuprac* dan penentuan panjang gelombang maksimum antara 400-600 nm dengan menggunakan

spektrofotometri UV.

Aktivitas larutan pembanding (kontrol positif) dan aktivitas antioksidan sampel dengan variasi konsentrasi yang sama (5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 75 ppm) dengan penambahan reagen *Cuprac* dan diinkubasi selama 30 menit diukur dengan absorbansi untuk beberapa larutan. Hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh dari analisis data aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai konsentrasi inhibisi (IC₅₀), yang dikaitkan dengan konsentrasi sampel (x) dengan aktivitas antioksidan sebagai% inhibisi (y) dari persamaan regresi linier, yang dinyatakan dalam persamaan garis $y=bx+a$ dimana nilai IC₅₀ dinyatakan sebagai nilai x dan ganti $y=50$ dengan rumus: $50=b(\text{IC}_{50}) +a$ dimana nilai b = koefisien regresi/slope dan a= intersep. Aktivitas antioksidan dinyatakan oleh besarnya IC₅₀ yang dihasilkan dari regresi.(10)

HASIL

Hasil Rendemen dan Total fenolik terhadap pengaruh suhu dan waktu proses ekstraksi daun melinjo (*Gnetum genom L*) ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Rendemen dan Kadar Fenolik Total berdasarkan pengaruh suhu dan waktu Ekstraksi

Suhu	Waktu Ekstraksi	Rendemen (%)	Rerata Total Fenol (mg GAE/gr)
45	30	1.68	53.04 ± 3.2
	45	2.14	74.10±3,56
60	30	2.16	83.27 ±2.29
	45	2.42	105.97±5.53
75	30	2.9	72.62±2.39
	45	3.33	45.76±2.72

Tabel 2. Aktivitas Antioksidan Terhadap Pengaruh suhu dan Waktu Ekstraksi

Suhu	Lama Waktu Ekstraksi	Rerata Aktivitas antioksidan (IC ₅₀)
45	30	89,745
	45	70,867
60	30	60,79651
	45	59,7953
75	30	59,865
	45	113,243

PEMBAHASAN

Pengujian ekstrak etanol daun melinjo (*Gnetum Gnetum L*) untuk mengetahui karakteristik aktivitas antioksidan yang optimal berdasarkan pengaruh suhu dan waktu yang dilihat dari banyaknya rendemen dan senyawa fenolik. Awal pengujian ditentukan kadar air yang merupakan salah satu sifat fisik untuk mengetahui kandungan air didalam ekstrak. Kadar air yang diperoleh dari ekstrak dengan berbagai variasi pengaruh (waktu dan suhu) menunjukkan <10% sesuai syarat kadar air ekstrak. Pengujian kadar air ini bertujuan banyaknya kandungan air yang dapat memudahkan tumbuhnya mikroorganisme perusak, terjadi reaksi hidrolisis dan oksidasi dan mengganggu daya simpan ekstrak dan sifat fisika serta kimia yang memudahkan terjadinya kerusakan produk⁽¹²⁾. Hal ini dipengaruhi proses pengeringan dan waktu pengeringan.

Dari tabel 1 menunjukkan bahwa suhu dan waktu maserasi (proses ekstraksi) menunjukkan pengaruh terhadap rendemen. Hasil rerata ekstrak etanol berdasarkan pengaruh suhu dan waktu lama proses ekstraksi antara 1,68-3,33% pada tabel 1. Peningkatan suhu dan waktu ekstraksi cenderung meningkatkan hasil ekstraksi yang lebih tinggi. Jumlah rendemen yang terekstrak dapat meningkat dengan mengatur suhu ekstraksi

Tabel 3. Skrining Fitokimia *

Metabolit skunder	Ekstrak Etanol
Flavonoid	+
Polifenol/ Fenolik	+
Alkaloid	+
Steroid	+
Triterpenoid	+
Tanin	+
Saponin	-

*) ekstrak etanol dengan suhu 60°C salam 45 menit

yang ditunjukkan bahwa rendemen tertinggi pada suhu 75°C. Jumlah senyawa bioaktif yang terlarut meningkat seiring dengan meningkatnya suhu ekstraksi yang disebabkan viskositas larutan yang semakin turun. Penurunan viskositasnya akan mengakibatkan perpindahan tahanan massa akan semakin kecil dan lebih mudah terekstrak. Selain itu, kenaikan suhu akan melunakkan jaringan dinding sel partikel padat sehingga mempermudah perpindahan zat terlarut ke pelarut dan memperbesar pori padatan serta melarutkan komponen padatan yang terabsorpsi sehingga zat terlarut berdifusi keluar permukaan padatan menuju ke larutan sehingga meningkatkan jumlah rendemen terekstrak⁽¹³⁾.

Waktu ekstraksi juga akan berpengaruh terhadap hasil rendemen pada 45 menit proses ekstraksi. Hal ini disebabkan kesempatan penetrasi pelarut kedalam sel akan semakin baik sehingga semakin banyak senyawa yang akan berdifusi ke luar sel. Waktu ekstraksi yang optimal dan tepat akan menghasilkan jumlah rendemen yang paling besar. Selain rendemen, waktu dan suhu akan memengaruhi kandungan fenol dan aktivitas antioksidan.

Fenol merupakan senyawa kimia memiliki gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada senyawa aromatic dimana dapat diujikan

melalui reagen Folin-Ciocalteu dengan prinsip reaksi oksidasi dan reduksi kolometrik untuk mengukur senyawa fenolik dalam ekstrak dengan pembanding asam galat untuk menentukan absorbansi. Kadar fenol total dipengaruhi waktu dan suhu serta pelarut. Pemilihan pelarut untuk metode masrasi (ekstraksi) berdasarkan sifat dari golongan fenol yang bersifat polar atau semi polar sehingga memerlukan pelarut yang memiliki konstanta dielektrik yang tinggi untuk mengeluarkan senyawa fenol dalam ekstrak yaitu etanol yang bersifat polar dan bisa mengikat banyak senyawa bioaktif.

Hasil rerata kadar fenol total terhadap pengaruh suhu dan waktu pada tabel 2 menunjukkan pada suhu 45°C dan 60°C dalam waktu 30-45 menit mencapai kenaikan kadar fenol namun pada suhu 75°C dengan waktu 30-45 menit menunjukkan penurunan kadar fenol total. Hal ini semakin naik suhu dari 45-60°C dan waktu 30-45 menit semakin meningkat kadar total fenol. Hal ini diduga karena penggunaan suhu yang rendah dapat mempertahankan fenol sehingga tidak mengalami degradasi. Sedangkan pada suhu 75°C mengalami penurunan karena semakin tinggi suhu akan semakin mudah mendegradasi fenol sehingga menjadi rusak atau terjadi penguapan komponen volatile fenol, atau terjadi reaksi senyawa fenol dengan komponen yang lain. Beberapa senyawa fenol bersifat termosensitif dan semakin tinggi suhu ekstraksi harus dikerjakan dengan baik dan hati-hati. Waktu ekstraksi yang terlalu lama memicu terjadi reaksi oksidasi senyawa fenolik karena adanya pemaparan oksigen yang banyak. Kadar fenolik yang optimal di ekstraksi pada suhu 60°C pada waktu 45 menit. Senyawa fenolik yang terkandung akan mempengaruhi aktivitas antioksidan.

Antioksidan memiliki struktur molekul

yang elektronnya diberikan pada molekul radikal bebas untuk memutuskan reaksi radikal dan dapat mencegah proses oksidasi. Metode antioksidan menggunakan Cuprac dengan prinsip ekstrak etanol daun melinjo dapat memiliki kemampuan untuk mereduksi Cu^{2+} menjadi kompleks Cu^+ yang ditandai dengan perubahan biru menjadi kuning. Metode ini sangat sederhana dalam penentuan antioksidan pada tanaman. Selain itu, cukup cepat mengoksidasi tiol salah satu golongan antioksidan⁽¹⁴⁾ serta reagen cuprac merupakan reagen kromogenik yang stabil untuk mengukur senyawa polar dan nonpolar yang bersifat antioksidan.

Parameter aktivitas antioksidan menginterpretasikan dilihat dari IC_{50} (Inhibition Concentration). IC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel yang dapat menyebabkan reduksi terhadap aktivitas cuprac sebesar 50% dimana semakin kecil nilai IC_{50} maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidan. Pengujian dilakukan dengan cara mengencerkan ekstrak dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 75 ppm sehingga diperoleh absorbansi. Dari tabel 3 menunjukkan suhu dan waktu maserasi memberikan pengaruh aktivitas antioksidan. Pada suhu 45-60°C menunjukkan penurunan IC_{50} , hal ini karena suhu relatif rendah sehingga kandungan senyawa fenol tidak mengalami degradasi sehingga meningkatkan aktivitas antioksidan. Turunnya aktivitas antioksidan seiring dengan lamanya maserasi serta kenaikan suhu maserasi yang berbanding lurus dengan keberadaan senyawa bioaktif yaitu total fenol dalam ekstrak etanol daun melinjo. Adanya kolerasi hubungan kadar fenol total dengan antioksidan berdasarkan pengaruh suhu dan waktu. Hal ini menjadikan bahwa total fenol dapat mempengaruhi sifat antioksidan karena komponen fenol dapat berfungsi sebagai antioksidan serta memiliki

kemampuan untuk menyumbangkan hydrogen dan senyawa fenol memiliki efek bioaktif karena memiliki gugus –OH atau –OR yang berperan sebagai gugus antioksidan.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan pengaruh suhu dan waktu maserasi terhadap rendemen, kadar fenol total dan aktivitas antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar fenol total ekstrak daun melinjo yang maksimal pada suhu 60°C pada waktu maserasi dengan etanol selama 45 menit sebesar 105.97 mg GAE/g yang berkaitan dengan aktivitas antioksidan yang ditunjukkan nilai IC₅₀ yang paling kecil sebesar 59,7953.

DAFTAR PUSTAKA

1. Utama SS, Mulkiya K, Syafnir L. Isolasi Senyawa Flavonoid yang Berpotensi sebagai Antioksidan pada Ekstraksi Bertingkat Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Pros Farm* [Internet]. 2019;0(0):717–25. Available from: <https://karyailmiah.unisba.ac.id/index.php/farmasi/article/view/18108>
2. Dewi C, Utami R, Riyadi NH. Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *J Teknol Has Pertan* [Internet]. 2012;5(2):hal 74-81. Available from: <https://jurnal.uns.ac.id/ilmupangan/article/view/13554/11298>
3. Nuralifah, Arjuna, Randa wulaisfan. Efektivitas Ekstrak Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Sebagai Antihiperqlikemia Pada Mencit (*Mus musculus*) Balb/C yang Diinduksi Streptozotocin. *Teknol Terap Berbas Kearifan Lokal*. 2018;503–7.
4. Septiani S, Wathoni N, Mita SR mita. Formulasi Sediaan Masker gel Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Biji Belinjo. *Fak Farm Univ Padjajaran*. 2011;2–4.
5. Bharali P, Dutta P, Kalita MC, Das AK, Tag H, Baruah AM. Evaluation of Antioxidant and Proximate Compositions of the Leaf Extract of *Gnetum Gnemon* L. *Int Res J Pharm*. 2018;9(10):101–5.
6. Sundawa AP, Trisnadi RA. Pengaruh Pemberian Vitamin C Dosis Tinggi Terhadap Kadar Tumor Necrosis Alfa pada Aktivitas Fisik Berat (Studi Eksperimental pada Tikus Galur Wistar Jantan). *Indones J Med Pharm Sci* [Internet]. 2022;1(2):36–40. Available from: <https://doi.org/10.30659/ijmps.v1i2.90>
7. Harborne JB. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Penerbit ITB. Bandung; 1996. 557 p.
8. Tameshia S. Ballard, Parameswarakumar Mallikarjunan, Kequan Zhou and SFO. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Peanut Skins Using Response Surface Methodology. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2009;57(8):3064–72. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf8030925>
9. Rujiyanti LM, Kunarto B, Pratiwi E. Pengaruh Lama Ekstraksi Kulit Melinjo Merah (*Gnetum gnemon* L.) Berbantu Gelombang Ultrasonik Terhadap Yield, Fenolik, Flavonoid, Tanin dan Aktivitas Antioksidan. *J Teknol Pangan dan Has Pertan*. 2020;15(1):17.
10. Susmayanti W, Rahmadani A. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Daun Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) Menggunakan Metode CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity). *Indones J Pharm Nat Prod*. 2023;06(01):97–106.
11. Haeria, Tahar N& M. Penentuan Kadar Flavonoid Dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera* L) Dengan Metode DPPH, CUPRAC Dan FRAP. *Jf Fik Uinam*. 2018;6(2):88–97.
12. F.G Winarno. *Kimia Pangan dan Gizi*. M-BRIO PRESS BOGOR; 2008.

13. Magaretta S, Handayani S dewi, Indraswati N, Hindarso H. Ekstraksi Senyawa Phenolic Pandanus Amaryllifolius. *Widya Tek.* 2011;10(1):21–30.
14. Hafiz Ramadhan, Baidah D, Lestari NP, Yuliana KA. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Daun, Buah dan Kulit Terap (*Artocarpus odoratissimus*) Menggunakan Metode Cuprac. *Farmasains J Ilm Ilmu Kefarmasian.* 2020;7(1):7–12.