



**SKRINING FRAKSI DAN MINYAK JERUK PURUT
(*Citrus hystrix D.C.*) SEBAGAI ANTIBAKTERI**

TESIS

Untuk Memenuhi Syarat
Memperoleh Gelar Magister



Oleh

RAHMATIKA AYU HABSARI

146090200111006

PROGRAM STUDI S2 KIMIA

BIDANG MINAT KIMIA ORGANIK

PROGRAM PASCASARJANA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2017

**LEMBAR PENGESAHAN TESIS****SKRINING FRAKSI DAN MINYAK JERUK PURUT****(*Citrus hystrix* D.C.) SEBAGAI ANTIBAKTERI**

Oleh:

Rahmatika Ayu Habsari

146090200111007

Setelah dipertahankan di depan Penguji

pada tanggal 23 Agustus 2017

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar **Magister Sains** dalam bidang **Kimia**

Menyetujui

Komisi Pembimbing

Ketua

Anggota

Dr. Warsito, MS

NIP.195907121985031004

Prof.Dr.Dr. Noorhamdani AS,Sp.MK

NIP. 195011101980021001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S2 Kimia
Fakultas MIPA Universitas BrawijayaSiti Mariyah Ulfa, S.Si., M.Sc., Dr.Sc

NIP. 198104062005022009



**SKRINING FRAKSI DAN MINYAK JERUK PURUT (*Citrus hystrix D.C.*)
SEBAGAI ANTIBAKTERI**

Nama Mahasiswa : Rahmatika Ayu Habsari

NIM : 146090200111006

Program Studi : Kimia

Minat : Kimia Organik

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Dr. Warsito, M.S

Anggota : Prof.Dr.Dr. Noorhamdani AS,Sp.MK

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Dr.Elвина Dhiaul Iftitah, S.Si, M.Si

Dosen Penguji 2 : Dr.Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes

Tanggal Ujian : 23 Agustus 2017

**LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS**

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Rahmatika Ayu Habsari

NIM : 146090200111006

Program Studi : Kimia

Bidang Minat : Kimia Organik

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila pernyataan di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Tesis ini digugurkan dan gelar akademik saya telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU.No 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Malang, 23 Agustus 2017

Yang membuat pernyataan,

Rahmatika Ayu Habsari

NIM. 146090200111006

**RIWAYAT HIDUP****IDENTITAS DIRI**

Nama Lengkap : Rahmatika Ayu Habsari
 Tempat dan Tanggal Lahir : Blitar, 22 Desember 1990
 Alamat : Perumahan Pondok Rindang C.219 A,
 Glanggang, Pakisaji, Malang
 Email : rahmatika.rah@gmail.com

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. SDN 1 Glanggang (1997-2002)
2. SMP Negeri 1 Kepanjen (2002-2005)
3. SMK Negeri 7 Malang (2005-2008)
4. Sarjana Pendidikan Kimia, MIPA, Universitas Negeri Malang (2009-2013)
5. Magister Kimia, MIPA, Universitas Brawijaya Malang (2014-2017)



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga tesis saya berjudul “Skrining Fraksi dan Minyak Jeruk Purut (*Citrus Hystrix D.C.*) sebagai Antibakteri” dapat terselesaikan dengan lancar.

Dalam proses penulisan dan penyelesaian tesis ini, penulis banyak mendapatkan bantuan, dukungan, arahan, serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dr. Warsito, MS selaku dosen pembimbing pertama, atas bimbingan, waktu, dan ilmu yang telah dibagikan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan tesis.
2. Prof.Dr.dr. Noorhamdani AS,Sp.MK selaku anggota pembimbing tesis, atas bimbingan, saran, dan kesabaran yang telah diberikan selama proses penulisan tesis ini.
3. Dr. Elvina Dhiaul Iftitah, S.Si, M.Si dan Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes selaku penguji tesis, atas nasihat, saran, dan motivasinya untuk lebih baik.
4. Siti Mariyah Ulfa, S.Si, M.Sc, Dr.Sc., sebagai Ketua Program Studi S2 Kimia Universitas Brawijaya atas semua bimbingan dan arahan yang diberikan.
5. Ibu Nanik selaku PLP Laboratorium Mikrobiologi atas segala bantuan, dan dukungan yang diberikan selama penulis melakukan penelitian.
6. Seluruh civitas akademik jurusan kimia yang telah banyak memberikan ilmu, selama penulis menempuh masa studi di Universitas Brawijaya Malang.



7. Seluruh dosen dan staf jurusan kimia yang telah memberikan ilmu, bimbingan dan bantuan selama perkuliahan.
8. Orangtua penulis, Ayah Sutrisno dan ibu Erna Agustina yang tidak pernah putus mendoakan dan memberikan dukungan moral dan materiil hingga terselesainya tesis ini.
9. Teman-teman seperjuangan S2 Kimia angkatan 2014/2015, teman belajar di Lab.Mikrobiologi MIPA Mbak Suci, Eva, Pak Bambang, Bu Sulis dan teman-teman kelompok penelitian Ima, Irul, Nasrul, ayu, fadiya, dan firda.
10. Semua pihak yang telah membantu selama proses penulisan proposal tesis ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi kesempurnaan tesis. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat, inspirasi, dan pengetahuan bagi semua pihak termasuk penulis sendiri.

Malang, 4 Mei 2017

Penulis



RINGKASAN

Rahmatika Ayu Habsari. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Mei 2016.

Skrining Fraksi dan Minyak Atsiri Jeruk Purut (*Citrus hystrix D.C*) Sebagai Antibakteri; Ketua Pembimbing: Dr. Warsito, MS, Anggota: Prof. Dr. dr. Noorhamdani, AS, Sp. MK

Kematian akibat penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri merupakan masalah yang serius dalam dunia kesehatan. Beberapa tahun terakhir, industri farmakologi telah menghasilkan sejumlah antibiotik baru, tetapi resistensi bakteri terhadap obat terus meningkat. Situasi tersebut memberikan dorongan untuk mencari zat antimikroba baru dari berbagai sumber contohnya tanaman herbal.

Salah satu tanaman herbal yang dimanfaatkan sebagai antimikroba baru dan sumber penghasil minyak atsiri yaitu tanaman jeruk purut. Penelitian mengenai komponen utama minyak atsiri dari daun, kulit buah dan ranting jeruk purut telah banyak dilakukan. Beberapa diantaranya memiliki berbagai aktivitas seperti larvasida dari nyamuk *Aedes aegypti*, antioksidan, dan antibakteri. Bervariasinya aktivitas biologis dapat dikaitkan dengan komposisi monoterpenoid hidrokarbon (MH) dan monoterpenoid teroksigenasi (MO) yang menyusun minyak atsiri jeruk purut. Komposisi penyusun minyak yang memiliki komposisi MO 3 kali lebih tinggi pada minyak jeruk daun menunjukkan aktivitas antimikroba, begitu juga dengan minyak kulit buah dengan komposisi penyusun MH lebih tinggi dari MO menunjukkan aktivitas antibakteri dan antioksidan yang lebih tinggi. Bervariasinya komposisi MO dan MH dalam minyak atsiri akan mempengaruhi aktivitasnya sebagai antibakteri. Suatu minyak atsiri yang memiliki aktivitas antibakteri rendah dapat diolah menjadi minyak yang memiliki komposisi kimia yang bervariasi dengan mengolahnya menggunakan destilasi fraksinasi. Sehingga ranting dipilih untuk ditingkatkan aktivitas antibakterinya dengan mengolahnya menggunakan destilasi fraksinasi.

Minyak jeruk purut dari daun (MJP-D), ranting (MJP-R) dan kulit buah (MJP-KB) diperoleh dengan destilasi air-uap selama 4 jam, sedangkan minyak fraksi diperoleh menggunakan destilasi fraksinasi dengan menggunakan rasio



reflux 20/10 dengan tekanan 5 mbar. Hasil keseluruhan minyak jeruk purut selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi dan dilusi pada bakteri *E.coli*.

Hasil persentase komponen utama penyusun minyak atsiri jeruk purut dari daun (MJP-D) diperoleh sitronelal (85,07%), linalool (3,46%), dan sabinen (2,79%), sedangkan pada sampel minyak atsiri jeruk purut dari kulit buah (MJP-KB) diperoleh β -pinen (21,44%), sitronelal (20,91%), dan limonene (12,59%). Persentase komponen utama penyusun minyak atsiri jeruk purut dari ranting (MJP-R) yaitu sitronelal (46,4%), linalool (13,11%), dan sitronelol (11,03%). Hasil aktivitas antibakteri dari ketiga minyak diperoleh zona hambat dengan rata-rat sangat kuat pada 500 μ L/ml masing-masing MJP-D, MJP-R, dan MJP-KB.

Tidak adanya pertumbuhan bakteri dari ketiga jenis minyak diperoleh MJP-KB pada konsentrasi 6,25 μ L/ml.

Komponen utama penyusun minyak fraksi diperoleh senyawa sitronelal (32,48%), diikuti sabinen (19,83%), dan linalool (8,17%) pada fraksi A. Minyak fraksi B diperoleh komponen sitronelal (50,65%), diikuti linalool (12,94%), dan sabinen (9,00%). Minyak fraksi C yaitu sitronelal (74,94%), diikuti linalool (20,13%), dan isopulegol (3,08%). Minyak fraksi D diperoleh sitronelal (84,86%), diikuti senyawa linalool (6,13%), dan isopulegol (4,35%). Minyak fraksi E diperoleh sitronelal (36,83%), diikuti isopulegol (2,09%) dan linalool (0,65%). Besarnya aktivitas antibakteri dari kelima fraksi diperoleh fraksi C dengan zona hambat rata-rata sangat kuat pada konsentrasi 500 μ L/ml. Tidak adanya pertumbuhan bakteri dari kelima jenis minyak diperoleh fraksi C dan D pada konsentrasi 50 μ L/ml. Hasil analisis statistik yang diperoleh tidak terdapat korelasi yang signifikan antara komponen MH dan MO dengan aktivitas antibakteri tetapi ditentukan oleh masing-masing komponen penyusun minyak yang berkontribusi terhadap aktivitas tersebut.



SUMMARY

Rahmatika Ayu Habsari. Post Graduate Program Universitas Brawijaya. Mei 2016.

Screening Fraction and Essential Oil of Kaffir Lime (*Citrus hystrix D.C*) As Antibacterial; Committee: Dr. Warsito, MS, Member of the Advisory Committee: Prof. Dr. dr. Noorhamdani, AS, Sp.MK

Deaths from diseases caused by bacterial infections are a serious problem in the world of health. In recent years, the pharmacology industry has produced a number of new antibiotics, but the bacterial resistance to drugs continues to increase. The situation provides an impetus to find new antimicrobial agents from a variety of sources such as herbs. One of the herbs is used as a new antimicrobial and a source of essential oils namely citrus kaffir. Research on the main components of essential oils of leaves, fruit skin and twigs of kaffir lime has been done. Some of them have various activities such as larvasida from *Aedes aegypti* mosquito, antioxidant, and antibacterial. Variations in biological activity can be attributed to the composition of monoterpenoid hydrocarbons (MH) and oxygenated monoterpenoids (MO) that make up the essential oil of kaffir lime. The oil composition composition having MO composition 3 times higher in leaf lemon oil showed antimicrobial activity, as well as fruit skin oil with higher MH constituent composition than MO showed higher antibacterial and antioxidant activity. The variation in MO and MH composition in volatile oil will affect its activity as an antibacterial. An essential oil having low antibacterial activity can be processed into an oil having varying chemical composition by processing it using fractionation distillation. So that twigs are selected for enhanced antibacterial activity by processing it by fractional distillation.

Leaf lime oil (MJP-D), twigs (MJP-R) and fruit peels (MJP-KB) were obtained by steam distillation for 4 hours, while fractional oil was obtained by fractionation distillation by using reflux ratio 20/10 with pressure 5 mbar. The overall yield of kaffir lime oil then tested its antibacterial activity using diffusion method and dilution on *E.coli* bacteria.



The result of percentage of the main components of essential oil of citrus leaves from leaves (MJP-D) was obtained by citronellal (85,07%), linalool (3,46%), sabinen (2,79%), fruit skin (MJP-KB) obtained β -pinen (21.44%), citronellal (20.91%), and limonene (12.59%). The percentage of the main components of the composition of citrus essential oil from twigs (MJP-R) were citronellal (46.4%), linalool (13.11%), and citronellol (11.03%). The results of antibacterial activity of the three oils obtained inhibit zone with very strong average at 500 μ L/ml respectively MJP-D, MJP-R, and MJP-KB. The absence of bacterial growth of the three types of oil obtained by MJP-KB at concentrations of 6.25 μ L / ml.

The main component of fractional oil compound was obtained by sitronelal compound (32,48%), followed by sabinen (19,83%), and linalool (8,17%) in fraction A. Oil fraction B obtained by sitronelal component (50,65%), followed linalool (12.94%), and sabinene (9.00%). Oil fraction C is citronellal (74.94%), followed by linalool (20.13%), and isopulegol (3.08%). Oil fraction D obtained citronellal (84.86%), followed by linalool compounds (6.13%), and isopulegol (4.35%). Oil fraction E obtained citronellal (36.83%), followed by isopulegol (2.09%) and linalool (0.65%). The magnitude of the antibacterial activity of the five fractions obtained fraction C with a very strong inhibition zone at a concentration of 500 μ L/ml. The absence of bacterial growth of the five types of oil obtained fractions of C and D at 50 μ L/ml concentration. The result of statistical analysis obtained there is no significant correlation between MH and MO component with antibacterial activity but determined by each component of oil constituents that contribute to the activity.



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kematian akibat penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri merupakan masalah yang serius dalam dunia kesehatan. Beberapa tahun terakhir, industri farmakologi telah menghasilkan sejumlah antibiotik baru, tetapi resistensi bakteri terhadap obat terus meningkat (Nascimento *et al.*, 2000). Solusi yang jelas belum ditemukan karena resistensi antibiotik yang kompleks dan efek samping dari obat yang perlu dipertimbangkan. Situasi ini memberikan dorongan untuk mencari zat antimikroba baru dari berbagai sumber contohnya tanaman herbal. Senyawa antimikroba yang berasal dari tanaman mampu menghambat pertumbuhan dan proliferasi mikroorganisme patogen (Souza *et al.*, 2000). Tanaman herbal dan rempah-rempah sebagai dasar obat tradisional di banyak Negara telah berlangsung sejak lama (Gendy *et al.*, 2015). Akhir-akhir ini, banyak penelitian mengenai skrining antimikroba dari ekstrak dan minyak atsiri dari tanaman sebagai agen antimikroba baru sebagai pilihan yang lebih ekonomis dan efektif (Niculae *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2004). Oleh karena itu, minyak atsiri dapat menjadi pilihan alternatif untuk penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri.

Minyak atsiri dapat diperoleh dari seluruh bagian tanaman termasuk bunga, daun, batang, ranting, buah, benih, akar, kayu, atau kulit kayu, (Bakkali *et al.*, 2008; Franz & Novak., 2010). Tanaman jeruk purut (*Citrus Hystrix*) merupakan salah satu tanaman herbal yang dimanfaatkan sebagai sumber penghasil minyak atsiri. Secara umum minyak atsiri jeruk purut tersusun atas



senyawa monoterpen, seskuiterpen, dan turunan teroksigenasi seperti alkohol, aldehida, ester, eter, keton, fenol dan oksida (Cowan, 1999; Kotan *et al.*, 2007).

Komponen utama penyusun minyak atsiri jeruk purut yaitu monoterpen seperti sitronelal, sabinen, linalool, β -pinen, limonene, dan lain-lain. Penelitian mengenai komponen utama minyak atsiri dari daun, kulit buah dan ranting jeruk purut telah banyak dilakukan. Khasanah (2015) melaporkan bahwa minyak atsiri dari daun jeruk purut dengan perlakuan pemeraman tersusun atas sitronelal 64,51%, β -sitronelol 10,71%, linalool 5,54%, dan *trans-caryophyllene* 5,31%. Sementara menurut Sutthanont (2010) dinyatakan bahwa komponen utama minyak kulit buah jeruk purut adalah β -pinen 22,54%, d-limonen 22,03% dan terpinene-4-ol 17,37%.

Warsito (2013) melaporkan bahwa komponen minyak ranting jeruk purut seperti sitronelal 46,40%, linalool 13,11%, sitronelol 11,03%, dan sabinen 5,91%.

Telah banyak dilaporkan pula bahwa minyak jeruk purut memiliki berbagai aktivitas seperti larvasida dari nyamuk *Aedes aegypti* (Sutthanont *et al.*, 2010), antioksidan (Warsito *et al.*, 2013), dan antibakteri (Srisukh *et al.*, 2012). Bervariasinya aktivitas biologis dari minyak jeruk purut ini berkaitan erat dengan komponen monoterpenoid hidrokarbon (MH) dan monoterpenoid teroksigenasi (MO) yang menyusun minyak atsiri jeruk purut.

Komposisi penyusun minyak jeruk purut dan aktivitasnya antibakterinya dilaporkan oleh beberapa peneliti seperti Wungsintaweekul (2010) melaporkan bahwa minyak jeruk purut dari daun dengan komposisi penyusun MO 3 kali lebih tinggi menunjukkan aktivitas antimikroba. Sementara Lan-phi (2015) melaporkan bahwa minyak jeruk purut dari kulit buah dengan komposisi utama penyusun MH lebih tinggi dari MO menunjukkan aktivitas antibakteri dan antioksidan yang



lebih tinggi. Bervariasinya komposisi MO dan MH dalam minyak atsiri akan mempengaruhi aktivitasnya sebagai antibakteri. Suatu minyak atsiri yang memiliki aktivitas antibakteri rendah dapat diolah menjadi minyak yang memiliki komposisi kimia yang bervariasi dengan mengolahnya menggunakan destilasi fraksinasi.

Penerapan tehnik destilasi fraksinasi ini merupakan tehnik pemisahan komponen berdasarkan perbedaan titik didih untuk senyawa-senyawa yang berdekatan dari komponen-komponen penyusunya. Dengan demikian menarik untuk dikaji pengolahan minyak jeruk purut dari ranting dengan destilasi fraksinasi untuk mengubah yang semula memiliki komposisi MO jauh lebih tinggi menjadi fraksi-fraksi yang komposisi kimianya dan aktivitas antibakterinya bervariasi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan beberapa rumusan masalahnya sebagai berikut:

1. Apakah minyak atsiri jeruk purut yang berasal dari daun, ranting, kulit buah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli*.
2. Apakah fraksi-fraksi minyak atsiri jeruk purut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli*.
3. Bagaimana korelasi komposisi MH dan MO dari minyak atsiri jeruk purut dan fraksi-fraksi minyak atsiri jeruk purut terhadap aktivitas antibakteri *E.coli*.



1.3 Batasan Masalah

1. Sampel minyak atsiri jeruk purut yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari hasil destilasi air-uap.
2. Fraksi minyak atsiri jeruk purut yang digunakan dalam sampel ini diperoleh dari hasil destilasi fraksinasi menggunakan tipe PiloDist 104-VTU yang dilakukan di LIPI.
3. Jenis bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu *E.coli* yang diperoleh dari Lab. mikrobiologi fakultas FMIPA.
4. Aktifitas uji antibakteri dalam penelitian ini yaitu difusi sumuran untuk mengetahui zona hambat dan pertumbuhan bakteri

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antibakteri minyak atsiri jeruk purut yang berasal dari daun, ranting, dan kulit buah terhadap bakteri *E.coli*.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri fraksi-fraksi minyak atsiri jeruk purut terhadap bakteri *E.coli*.
3. Mengetahui korelasi komposisi MH dan MO dari komponen minyak atsiri jeruk purut dan fraksi-fraksinya terhadap aktivitas antibakteri *E.coli*.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan peluang pengembangan bagian minyak jeruk purut yang lain sebagai bahan pengendali pertumbuhan bakteri.
2. Meningkatkan nilai tambah minyak jeruk purut dalam bidang obat-obatan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Komponen Minyak Atsiri dan Minyak Jeruk Perut

Minyak atsiri adalah campuran senyawa kompleks dari senyawa volatil dengan aroma yang kuat diperoleh dari beberapa organ tanaman, termasuk tunas, bunga, daun, batang, ranting, biji, buah akar, kayu atau kulit kayu. Minyak atsiri pada tanaman biasanya disimpan pada sel pembuangan, rongga, sel epidermis atau sel kelenjar trikoma (Franz and Novak, 2010; Bakkali *et al.*, 2008). Diperkirakan sekitar 3000 minyak atsiri telah diketahui, dan 300 diantaranya telah diperdagangkan. Komponen minyak atsiri tersusun atas campuran senyawa kompleks, terutama monoterpen, seskuioterpen, dan turunan teroksigenasinya (alkohol, aldehida, ester, eter, keton, fenol dan oksida). Umumnya, komposisi minyak atsiri merupakan keseimbangan berbagai senyawa, meskipun dalam banyak spesies satu konstituen mungkin semua prevailover lainnya (Cowan, 1999).

Masing-masing komponen utama minyak atsiri dapat berasal dari tiga jalur biosintesis yaitu, jalur mevalonate mengarah pada seskuioterpen, sedangkan jalur utama metil-erithritol mengarah pada mono- dan diterpenes, dan jalur asam shikimat mengarah pada phenylpropenes. Namun, terdapat sejumlah senyawa tunggal yang tak terhitung dan sangat bervariasi dalam komposisi minyak atsiri. Banyak dari senyawa volatil yang memiliki fungsi ekologis yang beragam. Mereka dapat bertindak sebagai penyampaian pesan internal, sebagai zat pertahanan atau sebagai musuh alami terhadap herbivora, dan sebagai penarik



serangga penyerbuk (Harrewijn *et al.*, 2001). Minyak atsiri juga sering digunakan untuk aroma atau rasa, selain itu minyak atsiri memainkan peran penting sebagai agen penyedap dalam industri makanan dan sebagai wewangian untuk industri parfum (Bruneton, 1999).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber penghasil minyak atsiri yaitu jeruk purut (*Citrus Hystrix*), *Citrus hystrix* DC, umumnya dikenal sebagai jeruk purut merupakan tanaman herbal didaerah tropis dari Family Rutaceae banyak dan banyak ditemukan di Asia Tenggara (Doreen *et al.*, 2011).

Tanaman jeruk purut merupakan tanaman semak berduri dengan daun yang beraroma khas dan buah jeruk purut yang berwarna hijau gelap dengan permukaan bergelombang tidak teratur.



(Safaatul & Prima, 2010)

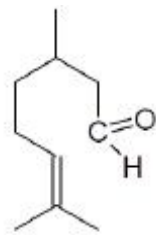
Gambar 2.1 Tanaman Jeruk purut

Jeruk purut kaya akan minyak atsiri pada beberapa bagian seperti daun, ranting, kulit buah dan jus buah (Akiyoshi *et al.*, 1990). Minyak atsiri jeruk purut dapat diperoleh dengan metode destilasi. Metode destilasi merupakan metode pemisahan komponen suatu campuran dari dua jenis cairan atau lebih berdasarkan tekanan uap dari masing-masing zat tersebut. Tekanan uap jenuh yang rendah

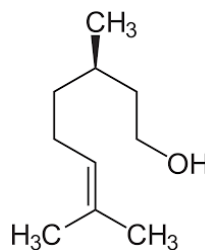


pada metode destilasi uap dapat menghasilkan kerusakan minyak lebih kecil, karena senyawa tersebut diuapkan sebelum mencapai titik didihnya, selain itu rendemen minyak lebih besar dengan kecepatan penguapan yang lebih lama (Guenthers, 1990).

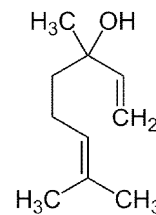
Hasil destilasi minyak jeruk purut umumnya terdiri dari senyawa monoterpen hidrokarbon (MH) maupun monoterpen teroksigenasi (MO) seperti sitronelal, sabinen, linalool, β -pinen, limonene, dan lain-lain. Senyawa monoterpenoid sendiri terbentuk dari dua molekul isoprene. Monoterpenoid terdiri dari monoterpenoid hidrokarbon (MH) maupun monoterpen teroksigenasi (MO), monoterpenoid hidrokarbon merupakan monoterpenoid yang terdiri dari unsur hidrogen dan karbon, sedangkan teroksigenasi terdiri dari unsur karbon, hidrogen, dan oksigennya. Struktur senyawa monoterpenoid hidrokarbon dan teroksigenasinya dapat dilihat pada Gambar 2.2



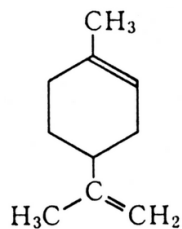
Sitronelal



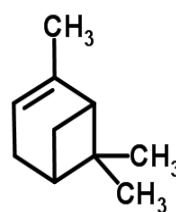
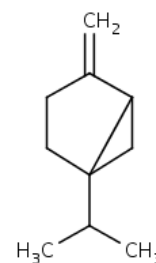
Sitronelol



Linalool



Limonen

 β -pinen

Sabinen

(Hyldgaard *et al*, 2012; Burt *et al*, 2004; Cowan *et al*, 1999)

Gambar 2.2 Struktur senyawa monoterpenoid hidrokarbon dan teroksigenasinya



Berbagai penelitian mengenai metode destilasi dan komponen minyak atsiri jeruk purut dilaporkan oleh Khasanah (2015) komponen minyak atsiri jeruk purut yang didestilasi dari daun memiliki komponen utama penyusunnya yaitu *Citronellal* (64,15%), *β -Citronelol* (10,71%), *Linalool* (5,54%), dan *Trans-Caryophyllene* (5,31%) yang didapat dari hasil destilasi daun jeruk purut dengan perlakuan pendahuluan pemeraman. Sedangkan Sutthanont (2010) melaporkan bahwa minyak atsiri jeruk purut dari kulit buah dengan destilasi uap memiliki komponen utama yaitu *β -pinene* (22,54%) dan *d-limonene* (22,03%) diikuti oleh *terpinene-4-ol* (17,37%). Sementara Warsito (2013) melaporkan minyak ranting jeruk purut yang diperoleh dengan destilasi uap-air bertekanan rendah memiliki komponen utama penyusun yaitu sitronelal (46,40%), linalool (13,11%), sitronelol (11,03%), dan sabinen (5,91%).

Komponen-komponen minyak atsiri jeruk purut yang bervariasi tersebut dapat dimurnikan dengan metode destilasi fraksinasi sehingga menghasilkan fraksi yang lebih murni. Distilasi bertingkat atau distilasi fraksinasi berguna untuk memisahkan komponen utama berdasarkan perbedaan titik didih yang berdekatan. Minyak atsiri umumnya tidak disuling pada tekanan atmosfer tetapi dalam keadaan vakum, karena pada tekanan atmosfer dan suhu tinggi dapat menyebabkan dekomposisi, dan resinifikasi, sehingga destilat mempunyai bau dan sifat fisika kimia yang berbeda dengan minyak murni (Guenthers, 1990).

2.2 Potensi Minyak Jeruk Purut sebagai Antibakteri

Minyak atsiri yang berasal dari rempah dan herbal memiliki kemampuan sebagai antimikroba alami yang paling menjanjikan karena tidak menyebabkan



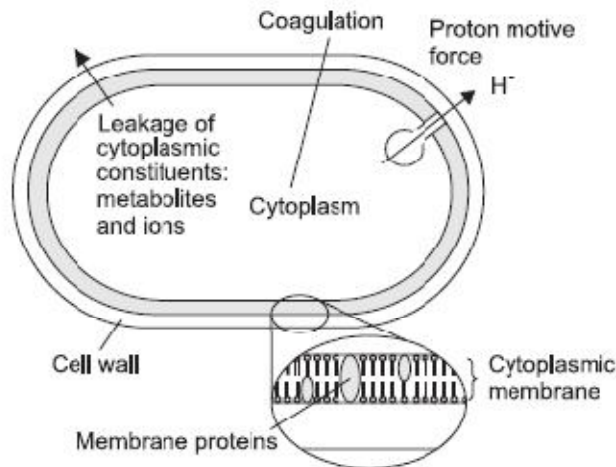
resistensi terhadap mikroba karena perbedaan mekanisme tindakannya (Dobre *et al.*, 2011). Minyak atsiri yang memiliki potensi sebagai antimikroba yaitu minyak jeruk purut.

Minyak jeruk purut telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa jenis mikroba seperti jamur, ragi, dan bakteri gram positif maupun gram negatif. Penelitian mengenai minyak jeruk mampu sebagai antibakteri terhadap berbagai jenis bakteri dengan daya hambat yang berbeda telah dilaporkan oleh (Srisukh *et al.*, 2012) bahwa minyak daun jeruk purut dan minyak kulit buah jeruk purut yang memiliki komponen utama penyusunnya seperti sitronelal, α -terpineol, terpinene-4-ol efektif mampu melawan bakteri-bakteri yang menginfeksi pernafasan dengan nilai KHM 0,06-68 mg/mL dan 0,03-17,40 mg/mL. Penelitian Chanthaphon (2008) menunjukkan bahwa komponen utama dari minyak kulit buah jeruk purut yang diekstrak dari etil asetat yaitu limonene (31,64%), sitronelal (25,96%), dan β -pinen (6,83%) mampu menghambat *Sac. cerevisiae var. sake* dan *B. cereus* dengan nilai KHM sebesar 0,28 mg/mL dan 0,56 mg/mL, serta menghambat *L. monocytogenes*, *A. fumigatus* TISTR 3180 dan *S. aureus* dengan nilai KHM yang sama 1,13 mg/mL. Bahkan ekstrak minyak kulit buah juga dapat membunuh *S. aureus*, *B. cereus* dengan nilai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimal) yang sama baiknya 1,13 mg/mL, serta *L. monocytogenes*, *A. fumigatus* TISTR 3180 dengan nilai KBM yang sama 2,25 mg/mL.

Antibakteri didefinisikan sebagai bahan yang digunakan untuk menghambat perkembangan bakteri dan mempunyai toksisitas selektif, dimana bahan tersebut hanya melemahkan patogen tetapi tidak berpengaruh pada inangnya (Jawetz *et al.*, 2010: 355). Secara umum, variasi aktivitas antibakteri



mungkin mencerminkan perbedaan dalam struktur permukaan sel antara gram-negatif dan gram positif; gram-positif menjadi lebih rentan terhadap tindakan asam fenolik daripada bakteri gram-negatif (Cueva *et al.*, 2010). Mekanisme antibakteri yang terjadi tergantung pada karakteristik masing-masing komponen minyak atsiri. Salah satu karakter yang dimiliki oleh komponen minyak yaitu hidrofobitasnya yang memungkinkan mereka untuk mempartisi lipid membran sel bakteri dan mitokondria, mengganggu struktur dan rendering minyak yang lebih permeabel (Knobloch *et al.*, 1986; Sikkema dkk., 1994). Kebocoran ion dan isi sel lainnya yang dapat terjadi (Oosterhaven *et al.*, 1995; Gustafson dkk., 1998; Helander *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Skandamis dkk., 2001; Carson *et al.*, 2002; Ultee dkk., 2002). Meskipun sejumlah kebocoran dari bakteri sel dapat ditoleransi tanpa kehilangan kelangsungan hidupnya, isi sel yang banyak hilang atau keluarnya molekul dan ion penting akan menyebabkan kematian (Denyer dan Hugo, 1991a). Mekanisme antibakteri dapat digambarkan pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Mekanisme antibakteri (Burt *et al.*, 2004)



Mekanisme dari tindakan sel bakteri dari senyawa bioaktif tanaman seperti degradasi dinding sel (Nychas & Tassou, 1999), kerusakan membran sitoplasma dan membran protein (Lambert *et al.*, 2001), kebocoran isi sel, koagulasi sitoplasma, dan menipisnya motif proton secara paksa (Burt, 2004; Gyawali & Ibrahim, 2014).

Beberapa cara serangan suatu zat antibakteri yang menyebabkan kerusakan pada salah satu struktur atau komposisi suatu sel mikroba diantaranya:

1) Rusaknya dinding sel

Dinding sel yang merupakan penutup, pelindung bagian sel dan berpartisipasi di dalam proses-proses fisiologis tertentu dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya, penghambatan pada sintesis dinding sel (sintesis peptidoglikan) dengan menghalangi langkah enzimatik dalam sintesis peptidoglikan. Kerusakan pada dinding sel akan berakibat terjadinya perubahan-perubahan yang mengarah pada kematian sel (Jawetz dan Adelberg, 1995).

2) Rusaknya membran semipermeabel (membran sitoplasmik)

Membran semipermeabel merupakan membran yang berfungsi untuk mempertahankan integritas kandungan selular, membran ini juga secara selektif mengatur keluar masuknya zat antara sel dan lingkungan luar, serta tempat untuk bereaksinya suatu enzim. Jika integritas fungsi dari membran sitoplasma terganggu, maka makromolekul dan ion akan lolos dari sel, dan terjadilah kerusakan atau kematian sel (Jawetz dan Adelberg, 1995).

3) Berubahnya permeabilitas sel

Membran plasma merupakan struktur yang semipermeabel yang mengendalikan pengangkutan substansi metabolik kedalam dan keluar sel. Kerusakan membran



ini akan mencegah berlangsungnya sejumlah biosintesis yang perlu di dalam membran. Selain itu kerusakan membran sel memungkinkan ion organik yang penting, koenzim dan asam amino merembes keluar sel dan mengakibatkan sel akan mati.

4) Rusaknya sintesis asam nukleat dan protein

Kelangsungan hidup sel sangat tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Pelczar dan Chan, 1986). Bahan antimikroba yang dapat merusak (mendenaturasi) protein dan asam nukleat tidak dapat diperbaiki lagi.

5) Menghambat kerja enzim

Di dalam sel terdapat enzim dan protein yang membantu kelangsungan proses-proses metabolisme sel. Aktifitas kerja enzim dapat dihambat oleh zat-zat kimia melalui berbagai cara. Zat kimia dapat menginaktifkan, mempengaruhi pembentukan atau bahkan mendenaturasi (merusak) enzim (Pelczar dan Chan, 1986).

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode *in vitro* untuk menentukan potensi suatu zat antibakteri dalam larutan, konsentrasi suatu zat antibakteri terhadap dinding sel dan jaringan, dan kepekaan suatu bakteri terhadap konsentrasi yang dikenakan. Penentuan kepekaan bakteri terhadap antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan dilusi (Choi *et al.*, 2006; Jenie, 2003). Metode difusi adalah suatu uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan suatu cakram kertas saring, atau cawan yang berlubang yang mengelilingi obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada pembenihan padat



yang telah ditanami dengan biakan bakteri yang diperiksa setelah pengeraman.

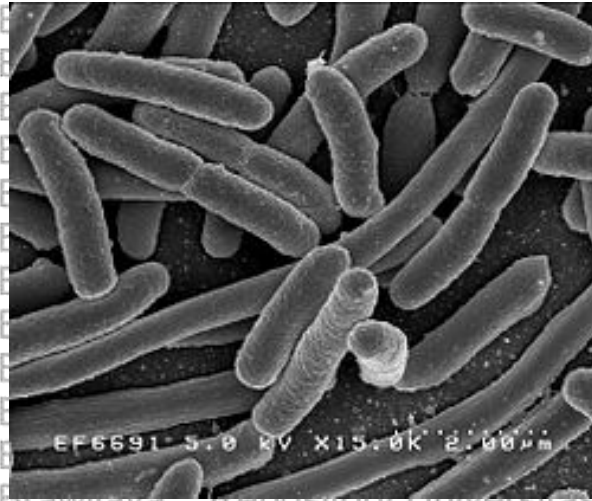
Daerah zona hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang diuji. Kriteria zona hambat menurut David & Stout (1971) ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kriteria besarnya zona hambat

Diameter zona hambat (mm)	Kriteria
≤ 5 mm	Lemah
6 - 10 mm	Kuat
>20 mm	Sangat kuat

Metode uji aktivitas antibakteri lainnya yaitu metode dilusi. Metode ini merupakan suatu uji aktivitas antibakteri dimana sejumlah zat antimikroba dimasukkan ke dalam medium bakteriologi padat atau cair, biasanya digunakan pengenceran dua kali lipat. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui seberapa banyak jumlah zat antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri yang diuji. Semakin kecil konsentrasi yang digunakan untuk membunuh bakteri menandakan semakin efektif zat antibakteri tersebut.

Salah satu bakteri negatif yang sering menyebabkan suatu penyakit yaitu bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*). *Escherichia coli* merupakan jenis bakteri yang menguntungkan pada usus manusia sebagai flora normal, namun sering juga ditemukan pada jaringan tubuh lain sebagai penyebab infeksi.



Gambar 2.4 Bakteri *E.coli* (Science Daily, 2008)

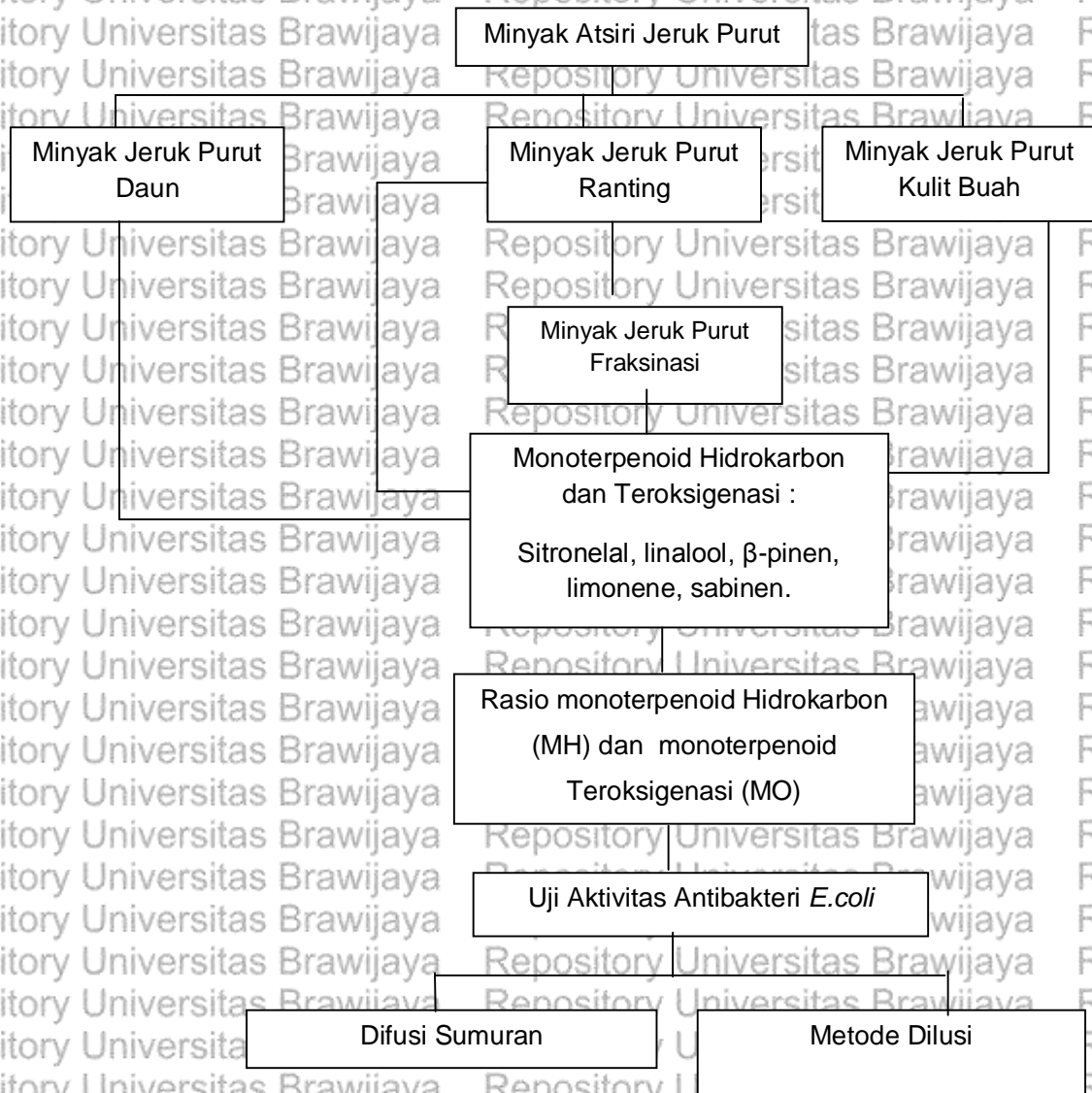
Bakteri ini berbentuk batang pendek (kokobasil), termasuk jenis Gram negatif, berukuran $0,4-0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$, diketahui beberapa strain memiliki kapsul (Karsinah *et al.*, 2010). *E. coli* diketahui merupakan penyebab utama infeksi usus yang menyebabkan diare terutama pada anak-anak yang banyak dikenal dengan sebutan travelers diarrhea. Selain diare, penyakit lain yang disebabkan oleh *E. coli* diantaranya adalah infeksi saluran kemih mulai dari sistitis hingga pielonefritis yang diketahui *E. coli* merupakan penyebab lebih dari 85% kasus. Ada juga infeksi luka yang disebabkan oleh *E. coli*, terutama pada luka abdomen (Karsinah *et al.*, 2010). Habitat *E.coli* secara alamiah hidup pada saluran gastrointestinal hewan berdarah panas dan manusia. Bakteri ini dapat menjadi patogen bila mencapai jaringan di luar saluran air kemih, saluran empedu, paru-paru atau otak yang menyebabkan peradangan pada tempat tersebut (Sjo'lund *et al.*, 2009).



BAB III

KERANGKA KONSEP

3.1. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian



3.2. Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian

Minyak atsiri jeruk purut diperoleh dari jalur metabolit sekunder tanaman jeruk purut. Jalur metabolit sekunder menghasilkan berbagai macam jenis komponen bergantung pada masing-masing bagian, seperti daun, ranting, dan kulit buah. Komponen penyusun minyak jeruk mayoritas merupakan komponen monoterpenoid. Komponen monoterpenoid sendiri terdiri dari monoterpen hidrokarbon dan teroksigenasi. Komponen tersebut pada masing-masing minyak memiliki komposisi yang berbeda bergantung pada jalur metabolit sekunder dan metode pemisahannya. Komponen dengan komposisi yang bervariasi dapat menentukan aktivitas biologisnya.

Aktivitas biologis minyak jeruk purut telah diketahui seperti larvasida, antioksidan dan antibakteri. Aktivitas-aktivitas tersebut dapat dikarenakan komponen penyusun minyak yang merupakan monoterpenoid hidrokarbon (MH) dan teroksigenasinya (MO) yang bervariasi. Beberapa peneliti seperti Wungsintaweekul (2010) melaporkan bahwa minyak jeruk purut dari daun dengan komposisi penyusun MO 3 kali lebih tinggi menunjukkan aktivitas antimikroba. Sementara Lan-phi (2015) melaporkan bahwa minyak jeruk purut dari kulit buah dengan komposisi utama penyusun MH lebih tinggi dari MO menunjukkan aktivitas antibakteri dan antioksidan yang lebih tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas biologis minyak yang salah satunya yaitu antibakteri dapat dikarenakan oleh komposisi monoterpen hidrokarbon dan teroksigenasinya yang bervariasi. Sementara aktivitas antibakteri yang rendah pada minyak dapat diolah menjadi minyak dengan komposisi kimia yang bervariasi. Komposisi yang



bervariasi pada minyak dapat diperoleh dengan destilasi fraksinasi. Destilasi fraksinasi merupakan pendekatan pemisahan komponen senyawa dengan perbedaan titik didih berdekatan. Aktivitas antibakteri pada minyak dapat diuji menggunakan metode difusi dan dilusi pada berbagai macam konsentrasi.

3.3. Hipotesis

1. Minyak atsiri jeruk purut dari daun, ranting, dan kulit buah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*.
2. Fraksi minyak atsiri jeruk purut dari daun, ranting, dan kulit buah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*.
3. Korelasi antara komposisi MH dan MO dari minyak atsiri jeruk purut dan fraksi minyak atsiri jeruk purut terhadap besarnya zona hambat.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik untuk preparasi minyak atsiri jeruk purut, Lab. Pusat Kimia LIPI di Serpong untuk destilasi fraksinasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya untuk uji aktifitas antibakteri. Penelitian ini dilakukan pada Bulan Agustus 2015 - Mei 2016.

4.2. Variabel Penelitian

4.2.1. Variabel Terikat

Diameter zona hambat

- Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*)

4.2.2. Variabel Bebas

- Jenis minyak (MJP-D, MJP-R, MJP-KB fraksi minyak A, B, C, D, dan E)
- Komposisi monoterpenoid hidrokarbon (MH) dan monoterpenoid teroksigenasi (MO)
- Konsentrasi minyak (100 $\mu\text{L/ml}$, 300 $\mu\text{L/ml}$, dan 500 $\mu\text{L/ml}$)



4.3. Bahan dan Alat Penelitian

4.3.1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun, ranting, buah jeruk purut yang diperoleh dari kebun Lab. Lapangan PUREA Kesamben, Blitar, dan sampel minyak atsiri jeruk purut dari ranting yang diperoleh dari hasil produksi petani lokal Ngunut, Tulungagung, Indonesia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu natrium sulfat anhidrat, media agar NA (*Nutrient Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), aquades, alkohol. Isolat bakteri uji dalam penelitian ini yaitu bakteri *E.coli* yang diperoleh dari Lab. Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

4.3.2. Alat

Alat destilasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat destilasi uap dan destilasi fraksinasi (spesifikasi PiloDist 104-VTU dengan panjang kolom 2 m dan jumlah stage 120), dan beberapa alat kaca seperti corong pisah, erlenmeyer, dan beaker glass. Alat untuk analisis minyak jeruk purut seperti neraca analitik, piknometer, refraktometer tipe Abbe, dan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer*) tipe Shimadzu QP 2010S.

Alat untuk aktifitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ose, tabung reaksi, vortex, inkubator, kaca spreader, neraca analitik, erlenmeyer, cawan petri, pengaduk, kapas, pinset, coke bore, mikro pipet, mikroskop, autoklaf, hemasitometer.

4.4. Tahapan Penelitian



Adapun tahapan penelitian meliputi:

1. Preparasi Sampel Penelitian.

1.1. Destilasi Air-Uap Minyak Jeruk Purut.

1.2. Destilasi Fraksinasi Minyak Jeruk Purut.

2. Analisis Fisika-Kimia Minyak Jeruk Purut.

2.1. Penentuan Berat Jenis.

2.2. Penentuan Indeks bias.

2.3. Analisis dengan GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer).

3. Uji Aktifitas Antibakteri

3.1. Sterilisasi alat.

3.2. Pembuatan media *Nutrien Agar* (NA) dan *Nutrien Broth* (NB).

3.3. Peremajaan biakan murni bakteri.

3.4. Pembuatan suspensi bakteri.

3.5. Uji aktifitas antibakteri dengan metode difusi agar sumuran.

3.6. Pengujian Antibakteri Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM)

4. Analisis Data

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Preparasi Sampel Penelitian

4.5.1.1. Destilasi Air-Uap Minyak Jeruk Purut

Ditimbang 2 Kg daun jeruk purut dimasukkan dalam ketel uap untuk didestilasi air-uap selama 4 jam, dengan cara yang sama untuk sampel kulit buah. Distilat yang mengandung minyak dan air dimasukkan



dalam corong pisah. Lapisan minyak dipisahkan kemudian ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk menyerap partikel air yang masih bercampur.

Selanjutnya minyak disimpan dalam wadah yang kedap udara disimpan dalam suhu 4° C. Hasil destilasi minyak dianalisis menggunakan GC-MS.

Proses destilasi ini dapat dilihat pada Lampiran 2.1.

4.5.1.2. Destilasi Fraksinasi Minyak Jeruk Purut

Diambil sebanyak 2 L minyak atsiri jeruk purut dari ranting dimasukkan dalam labu alas bulat kemudian didestilasi dibawah penurunan tekanan hingga 5 mbar. Selama destilasi berlangsung diatur rasio reflux 20/10. Penampungan setiap fraksi didasarkan atas hasil perhitungan volume teoritis dari kromatogram GC-MS minyak jeruk purut dari ranting. Hasil fraksinasi dianalisis menggunakan GC-MS. Proses destilasi ini dapat dilihat pada Lampiran 2.2. Hasil fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak fraksi A, B, C, D, dan E.

4.5.2. Analisis Kimia Minyak Jeruk Purut

4.5.2.1. Analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer*)

Sampel minyak atsiri jeruk purut atau fraksi diambil dengan siring sebanyak 1 µL yang diinjeksikan ke GC-MS (tipe Shimadzu QP 2010S) dilengkapi dengan kolom kapiler (panjang 30m, diameter dalam 0,25mm) dengan kondisi operasi sebagai berikut: sistem elektron yang ditembakkan dengan energi ionisasi sebesar 70eV (temperatur injektor 300° C; temperatur detektor 320°C; tekanan 12 Pa). Temperatur kolom awalnya



pada suhu 50° C, dan mengalami kenaikan temperatur sampai 260° C dengan peningkatan temperatur 5° C/menit. Gas pembawa yang digunakan adalah Helium dengan laju sebesar 3 ml/menit. Komponen diidentifikasi dengan membandingkan waktu retensi dan struktur senyawa ditentukan dengan membandingkan spektra massa dalam NBS75K library dari sistem GC-MS (Adam, 2001).

4.5.3. Uji Aktifitas Antibakteri

4.5.3.1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, dengan cara semua alat dibungkus dengan menggunakan kertas atau aluminium foil lalu disterilkan dalam autoklaf pada 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20-30 menit.

4.5.3.2. Pembuatan Media *Nutrien Agar* (NA) dan *Nutrien Broth* (NB)

Pembuatan media NA (*Nutrient Agar*) dilakukan dengan cara serbuk media NA ditimbang sebanyak 4 gram dan dilarutkan dalam 200 ml aquades dalam erlenmeyer dan ditutup aluminium foil. Suspensi dipanaskan hingga mendidih lalu disterilkan dalam autoklaf dan diatur pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20-30 menit. Kemudian media yang telah steril dimasukkan dalam tabung-tabung reaksi dan ditutup kapas yang diletakkan dalam posisi miring hingga agar membeku.

Proses pembuatan media NA dapat dilihat pada Lampiran 3.1.



Pembuatan media NB dilakukan dengan cara serbuk media NB ditimbang sebanyak 0,9 gram dan dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam Erlenmeyer dan ditutup aluminium foil. Suspensi di autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20-30 menit. Proses pembuatan media NB dapat dilihat pada Lampiran 3.2.

4.5.3.3. Peremajaan Biakan Murni Bakteri

Biakan murni dari bakteri diremajakan pada media agar miring NA yang telah membeku, dengan cara 1 jarum ose biakan bakteri dari kultur murni digoreskan pada media agar miring NA secara aseptis. Kemudian media agar miring di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Proses peremajaan bakteri ini dapat dilihat pada Lampiran 3.3.

4.5.3.4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan menyiapkan media cair NB steril dalam tabung reaksi. Kultur dari agar miring diambil 1 ose kemudian diinokulasi pada media NB. Media selanjutnya di vortex untuk dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Langkah selanjutnya, sebanyak 1 ml kultur bakteri dari NB dimasukkan ke 9 ml media NB. Suspensi tersebut merupakan pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilakukan sampai diperkirakan jumlah bakteri adalah 10^6 CFU/ml yang dihitung secara langsung dengan menggunakan hemositometer (Oktavia, 2013). Proses pembuatan suspensi bakteri ini dapat dilihat pada Lampiran 3.4.



4.5.3.5. Metode Difusi Agar Sumuran

Uji aktivitas antibakteri dari minyak atsiri ditentukan menggunakan metode difusi sumuran (Sarikurkcu, 2015) dengan sedikit modifikasi. Cawan petri yang telah berisi agar NA ditambahkan suspensi bakteri yang akan diujikan dengan konsentrasi suspensi sel yang telah ditentukan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml sebanyak 100 μ L menggunakan mikropipet, dan diratakan menggunakan kaca spreader. Pada media agar NA dibuat lubang sumuran dengan menggunakan cork bore dengan diameter 6 mm. Larutan sampel minyak dibuat dengan konsentrasi 500 μ L/ml, 300 μ L/ml, 100 μ L/ml, alkohol sebagai kontrol positif, dan aquades sebagai kontrol negatif, masing-masing dari konsentrasi tersebut dimasukkan 50 μ L kedalam masing-masing sumuran. Proses pembuatan larutan dengan konsentrasi yang telah ditentukan dapat dilihat pada Lampiran 4.1. Cawan petri yang telah berisi minyak yang diujikan pada masing-masing sumuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona hambat pada uji antibakteri ini diamati dengan mengukur besarnya zona bening dengan menggunakan jangka sorong. Proses uji bakteri ini dapat dilihat pada Lampiran 3.5.

4.5.3.6. Metode Dilusi

Uji aktivitas antibakteri juga dapat ditentukan dengan menggunakan metode dilusi. Metode ini biasa dikenal dengan penentuan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Metode pengujian KBM yang digunakan sesuai dengan Zhang (2016) dengan sedikit modifikasi.



Langkah pertama, 1 ml NB masing-masing dimasukkan ke dalam 9 tabung uji, lalu ditambahkan 1 ml sampel minyak kedalam tabung pertama dan dibuat pengenceran berseri dari konsentrasi 50 $\mu\text{L}/\text{ml}$ -1,56 $\mu\text{L}/\text{ml}$ serta kontrol berupa minyak, Original Inokulum (OI), dan etanol 96%.

Perhitungan pengenceran minyak dapat dilihat pada Lampiran 4.2.

Selanjutnya suspensi bakteri uji sebanyak 1 ml ditambahkan ke masing-masing tabung dan diinkubasi pada 120 rpm dalam *shaker* inkubator untuk semalam. Selanjutnya 0,1 ml dari setiap pengenceran seri di *pourplate* pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*). Setelah itu, media uji di inkubasi selama 24 jam dan dilakukan pengamatan ada tidaknya koloni. Proses uji bakteri ini dapat dilihat pada Lampiran 3.6.

4.5.4. Analisis Data

Korelasi antara komposisi monoterpenoid hidrokarbon (MH) atau teroksigenasi (MO) dengan zona hambat dianalisis menggunakan korelasi *pearson* pada *SPSS 16*. Hasil yang diperoleh diperiksa dengan taraf signifikan 5% ($\alpha=0,05$).



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Jeruk Purut Yang Berasal dari Daun, Ranting, dan Kulit Buah terhadap Bakteri *E.coli*.

5.1.1. Hasil Analisis Komposisi Minyak Atsiri Jeruk Purut

Pada penelitian ini untuk memperoleh minyak jeruk purut dari daun (MJP-D), ranting (MJP-R), dan kulit buah (MJP-KB) dapat dilakukan dengan destilasi uap. Metode ini digunakan untuk memperoleh minyak dengan tekanan rendah hingga tekanan tinggi. Hal ini dapat mempengaruhi besarnya sel dan pori-pori bahan untuk mengeluarkan minyak, sehingga diperoleh minyak yang tidak mudah terdekomposisi. Hasil minyak jeruk purut dari masing-masing bahan yang diperoleh, selanjutnya dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer* (GC-MS) untuk mengetahui komposisi penyusun masing-masing minyak jeruk purut. Komposisi penyusun masing-masing minyak pada GC-MS mengalami fragmentasi ion molekul yang khas dan selanjutnya akan ditangkap detector yang berupa kromatogram TIC (*Total Ionic Chromatogram*). Kromatogram tersebut didasarkan atas urutan titik didih senyawa yang sebanding dengan massa molekul senyawa. Massa molekul senyawa tersebut ditentukan pola fragmentasinya melalui *Library Mass Spectra* tersebut, sehingga diperoleh komponen senyawa yang menyusun minyak tersebut. Hasil kromatogram analisis GC-MS komponen penyusun minyak masing-masing dapat dilihat pada Lampiran 15, sedangkan hasil komponen minyak atsiri jeruk purut yang telah dianalisis disajikan pada Tabel 5.1.



Tabel 5.1 Komponen minyak jeruk purut dari daun, ranting dan kulit buah

No	Nama Senyawa	MJP-D (%)	MJP-KB (%)	MJP-R (%)
1	Peladren	-	0,1	-
2	α -Pinen	-	1,56	-
3	Sabinen	2,79	9,21	5,91
4	β -Pinen	0,33	21,44	1,24
5	β -Micren	1,04	1,98	1,27
6	Cimene	-	0,34	0,8
7	α -Terpinene	-	1,23	-
8	Limonen	0,13	12,59	0,9
9	β -Ocimen	0,44	-	1,56
10	γ -Terpinen	-	2,29	0,51
11	Linalol oksida	0,7	3,29	-
12	Linalol oksida	0,33	1,57	0,69
13	Terpenilona	-	0,62	-
14	Linalool	3,46	4,23	13,11
15	Sitronelal	85,07	20,91	46,4
16	Isopulegol	-	-	1,57
17	Terpenen-4-ol	-	11,93	1,52
18	α -Terpeniol	-	5,16	-
19	2-nitrooctan-1-ol	-	-	0,93
20	Sitronelil asetat	2,77	0,46	6,76
21	Geranil asetat	0,61	0,43	0,77
22	Bisiklo-Germakren	0,3	-	-
23	Kopaene	-	0,18	-
24	Karyopilen	1,77	0,24	1,48
25	Kadinen	0,22	0,23	-
26	Nerodinol	-	-	1,11
27	β -sitronelol	-	-	11,03
28	β -sitronelol	-	-	0,59
29	5,9-Dimethyl-1-Decanol	-	-	1,86
	% Identifikasi	99,96	99,35	100

Keterangan: MJP-D: minyak jeruk dari daun, MJP-R: minyak jeruk dari ranting, MJP-KB: minyak jeruk dari kulit buah

Dari Tabel 5.1 diperoleh komposisi penyusun minyak atsiri jeruk purut dari daun (MJP-D), ranting (MJP-R) dan kulit buah (MJP-KB) mengandung berbagai macam campuran komposisi senyawa. Hasil analisis berat molekul dari kromatogram GC-MS menunjukkan 29 komponen terdapat pada ketiga minyak dengan persentase komponen utama penyusun minyak jeruk purut yang bervariasi. Persentase komponen utama penyusun minyak atsiri jeruk purut dari daun (MJP-D) diperoleh sitronelal (85,07%), linalool (3,46%), dan sabinen (2,79%), sedangkan pada sampel minyak atsiri jeruk purut dari kulit buah (MJP-



KB) diperoleh β -pinen (21,44%), sitronelal (20,91%), dan limonene (12,59%).

Persentase komponen utama penyusun minyak atsiri jeruk purut dari ranting (MJP-R) yaitu sitronelal (46,4%), linalool (13,1%), dan sitronelol (11,03%).

Struktur komponen utama penyusun minyak jeruk purut dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Hasil yang tidak jauh berbeda dilakukan oleh Khasanah (2015) dengan mendestilasi uap daun jeruk purut yang diperoleh dari Pasar Legi, Surakarta menghasilkan MJP-D dengan komposisi penyusun utama yaitu sitronelal (64,51%), β -sitronelol (10,71%), linalool (5,54%), dan *trans-caryophyllene* (5,31%). Perbedaan hasil komponen penyusun minyak atsiri jeruk purut dari daun (MJP-D) dapat dikarenakan perbedaan letak geografis tanaman dan iklim suatu daerah tanaman tersebut yang dapat mempengaruhi kadar komponen penyusun minyak atsiri (Nickavar, 2004). Komponen utama penyusun MJP-KB yang dilakukan oleh Noor (1999) yaitu β -pinen (23,45%), sabinen (20,13%), dan sitronelal (12,56%) dengan cara mengekstrak kulit buah jeruk purut selama 3 jam, perbedaan komposisi komponen penyusun minyak jeruk purut dari kulit buah (MJP-KB) pada penelitian ini dapat dikarenakan perbedaan metode yang digunakan untuk memperoleh minyak. Selain itu, faktor-faktor yang berhubungan dengan tanaman itu sendiri seperti bagian dari tanaman, kondisi pemeliharaan, tingkat kematangan dari tanaman, dan penyimpanan suatu tanaman (Vieira dan Simon 2000, Tawatsin *et al.* 2001).



5.1.2. Hasil Aktivitas Antibakteri Minyak Jeruk Purut Daun, Ranting dan Kulit Buah terhadap bakteri *E.coli*

Penentuan aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi digunakan untuk mengetahui kerentanan antibakteri yang digunakan sebagai prosedur awal (Donato *et al*, 2015). Pada penelitian ini metode difusi dipilih menggunakan metode sumuran karena metode ini umumnya digunakan untuk screening aktivitas antibakteri (Burt *et al*, 2004).

Metode difusi sumuran menghasilkan zona bening disekitar lubang sumuran pada media yang telah dibiakan bakteri uji dalam penelitian ini yaitu *E.coli*. Hasil zona hambat yang diperoleh dikategorikan menggunakan kategori David and stout (1971) yang mana < 5 mm memiliki kategori lemah, 6-10 mm memiliki kategori kuat dan > 20 mm dengan kategori sangat kuat. Pada penelitian ini konsentrasi yang diujikan yaitu konsentrasi 100, 300, dan 500 µL/ml. Hasil zona hambat masing-masing minyak dan konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 5. Hasil rerata zona hambat dari masing-masing minyak dan konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata hasil zona hambat minyak atsiri jeruk purut

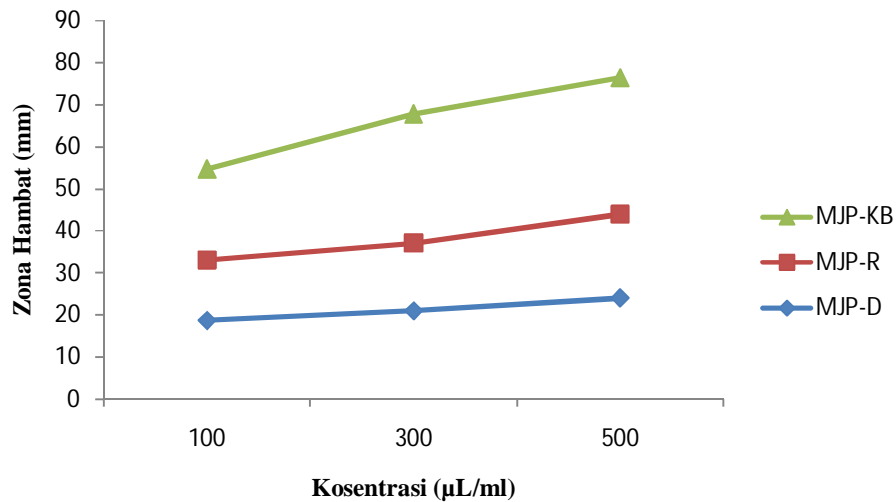
Sampel	Hasil Zona Hambat (mm)					
	100 µL/ml	Kategori	300 µL/ml	Kategori	500 µL/ml	Kategori
MJP-D	18,7	Kuat	21,0	Sangat Kuat	24,1	Sangat Kuat
MJP-R	14,4	Kuat	16,1	Kuat	19,9	Kuat
MJP-KB	21,6	Sangat Kuat	30,7	Sangat Kuat	32,4	Sangat Kuat

Keterangan: MJP-D: Minyak jeruk purut daun, MJP-R: Minyak jeruk purut ranting, MJP-KB: Minyak jeruk purut kulit buah.

Dari Tabel 5.2 ketiga jenis minyak pada diperoleh zona hambat, hal ini menandakan ketiga jenis minyak jeruk purut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli*. Aktivitas antibakteri ketiga minyak jeruk purut.



menghasilkan zona hambat yang bervariasi. Bervariasinya besarnya zona hambat pada penelitian ini dapat dikarenakan pengaruh konsentrasi dan jenis minyak yang digunakan dalam pengujian. Terdapatnya pengaruh konsentrasi terhadap besarnya rata-rata zona hambat dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Pengaruh konsentrasi terhadap zona hambat

Gambar 5.1 menunjukkan bahwa konsentrasi mempengaruhi besarnya zona hambat, hal tersebut ditunjukkan pada ketiga jenis sampel pada konsentrasi 100 µL/ml besarnya rata-rata zona hambat mengalami kenaikan pada konsentrasi 500 µL/ml. Pengaruh besarnya konsentrasi terhadap besarnya rata-rata zona hambat dapat dikarenakan pengaruh peningkatan jumlah komponen aktif dalam minyak yang diujikan sehingga mempengaruhi aktifitas zona hambat tersebut (Varahalarao dan Kaladhar, 2012; Sekar *et al.*, 2012). Pengaruh besarnya rata-rata zona hambat juga dikarenakan perbedaan jenis minyak uji yang digunakan, perbedaan tersebut dapat ditunjukkan pada Gambar 5.1 maupun Tabel 5.2 yang menunjukkan bahwa sampel minyak jeruk purut kulit buah (MJP-KB) memiliki rata-rata zona hambat dengan kategori sangat kuat diikuti konsentrasi yang terus



meningkat. Hal ini dikarenakan aktivitas dari minyak jeruk purut kulit buah (MJP-KB) dapat dihubungkan dengan kehadiran dari konstituen dari komponen utama minyak dari segala minyak yang diujikan (Nikolic *et al*, 2014). Komponen utama penyusun sampel minyak MJP-KB pada penelitian ini yaitu β -pinen 21,44% dimana mekanisme β -pinen mampu menghancurkan integritas selular sehingga menghambat proses respirasi dan transportasi ion (Zhu *et al*, 2012).

Aktivitas antibakteri juga dapat diketahui melalui metode dilusi. Pada metode ini zat antimikroba dimasukkan ke dalam media cair yang telah diisi oleh bakteri *E.coli* dan dilakukan pengenceran berseri, penentuan aktivitas antibakteri yang baik dapat dilihat dari konsentrasi terendah dari minyak atsiri yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% dari jumlah koloni dari OI (Original Inokulum). Pada penelitian ini hasil pertumbuhan bakteri untuk pengujian minyak jeruk purut dari daun (MJP-D), ranting (MJP-R), dan kulit buah (MJP-KB) dapat dilihat pada Lampiran 6, sedangkan hasil rata-rata pertumbuhan bakteri dari MJP-D, MJP-R, dan MJP-KB disajikan pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil rata-rata pertumbuhan bakteri dari MJP-D, MJP-R, dan MJP-KB

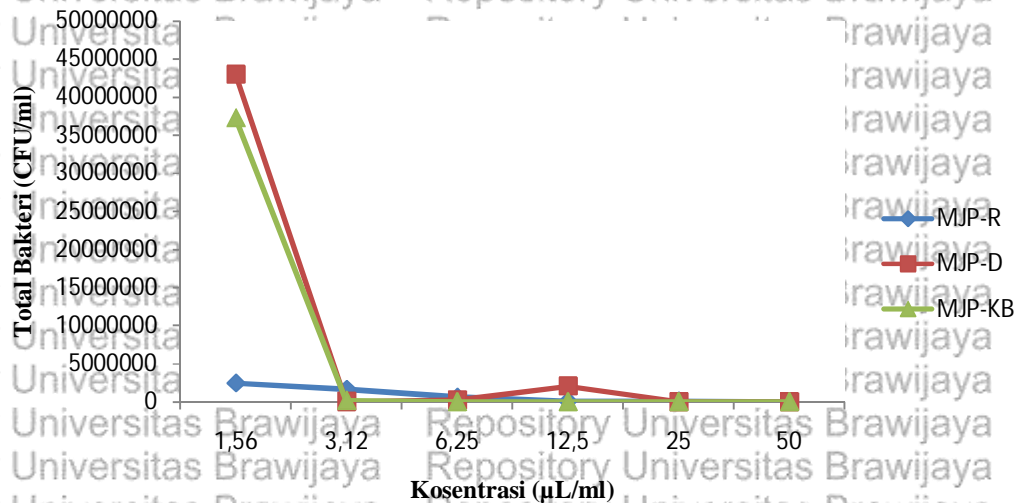
Sampel	Pertumbuhan bakteri (CFU/ml)						OI (CFU/ml)
	50 $\mu\text{L/ml}$	25 $\mu\text{L/ml}$	12,5 $\mu\text{L/ml}$	6,25 $\mu\text{L/ml}$	3,12 $\mu\text{L/ml}$	1,56 $\mu\text{L/ml}$	
MJP-D	0	0	$2,0 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^3$	$43 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$
MJP-R	$4,6 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	
MJP-KB	0	0	0	0	$1,8 \cdot 10^5$	$37 \cdot 10^6$	

Keterangan: MJP-D: Minyak jeruk purut daun, MJP-R: Minyak jeruk purut ranting, MJP-KB: Minyak jeruk purut kulit buah.

Dari Tabel 5.3 diperoleh bahwa minyak jeruk purut kulit buah (MJP-KB) menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik dari MJP-D dan MJP-R. Hal



tersebut ditunjukkan bahwa MJP-KB diperoleh pada konsentrasi 6,25 $\mu\text{L/ml}$ tidak terdapat pertumbuhan bakteri, begitu juga pada MJP-D pada konsentrasi 25 $\mu\text{L/ml}$ tidak terdapat pertumbuhan bakteri, sedangkan MJP-R pada konsentrasi 50 $\mu\text{L/ml}$ masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri. Kecenderungan pertambahan konsentrasi dengan pertumbuhan bakteri dari ketiga jenis minyak juga ditunjukkan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Jumlah koloni bakteri dari ketiga jenis minyak jeruk purut

Gambar 5.2 menunjukkan bahwa dengan semakin meningkatnya konsentrasi semakin sedikit bakteri yang tumbuh, hal ini dikarenakan semakin bertambahnya volume yang digunakan, semakin besar pula komponen aktif yang terkandung dalam minyak (Parekh *et al.*, 2007). Hasil pertumbuhan bakteri juga dipengaruhi oleh perbedaan sampel minyak yang digunakan, yang mana minyak jeruk kulit buah (MJP-KB) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi yang paling kecil yaitu 6,25 $\mu\text{L/ml}$. Hal tersebut dapat dikarenakan pengaruh komponen utama penyusun minyak yang dapat memberikan aktivitas antibakteri (Höferl *et al.*, 2009). Komponen utama penyusun minyak diperoleh



dari analisis yaitu β -pinen, yang mana komponen α -pinen, β -pinen telah dilaporkan memiliki efek antibakteri yang kuat (Dorman dan Deans, 2000; Sassi *et al.*, 2008).

5.2. Aktivitas Antibakteri Fraksi-Fraksi Minyak Jeruk Purut Terhadap Bakteri *E.coli*

5.2.1. Hasil Analisis Komposisi Fraksi-Fraksi Minyak Jeruk Purut

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh bahwa aktivitas antibakteri pada MJ-PKB diperoleh memiliki aktivitas yang lebih baik dari MJ-PD maupun MJ-PR pada metode difusi dan dilusinya. Aktivitas antibakteri yang rendah dapat dikarenakan komposisi penyusun MJ-PR seperti sitronelal maupun β -pinen yang rendah. Komposisi penyusun utama MJ-PR yang rendah dapat ditingkatkan dengan destilasi fraksinasi. Destilasi fraksinasi dilakukan untuk meningkatkan komponen aktif yang terdapat pada minyak berdasarkan titik didih antar komponen yang berdekatan. Hasil destilasi fraksinasi diperoleh yaitu lima minyak fraksi yang berdasarkan interval suhunya, fraksi A (63,00 – 70,01⁰C), fraksi B (71,30 – 70,80⁰C), fraksi C (74,50 – 74,20⁰C), fraksi D (74,20 – 74,00⁰C) dan fraksi E (72,90 – 91,10⁰C). Komposisi penyusun fraksi minyak juga dianalisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer*) dengan data yang diperoleh berupa kromatogram TIC (*Total Ionic Chromatogram*). Hasil analisis GC-MS yang berupa kromatogram masing-masing fraksi minyak dapat dilihat pada Lampiran 15, sedangkan hasil analisis komponen penyusun fraksi minyak dari hasil analisis GC-MS dilihat pada Tabel 5.4.



Pada Tabel 5.4 diperoleh bahwa komposisi penyusun fraksi minyak dari masing-masing fraksi bervariasi. Pada fraksi minyak A diperoleh komponen yang memiliki kadar tertinggi diperoleh pada senyawa sitronelal (32,48%), diikuti sabinen (19,83%), dan linalool (8,17%). Fraksi minyak B diperoleh komponen yang paling tinggi yaitu sitronelal (50,65%), diikuti linalool (12,94%), dan sabinen (9,00%), begitu juga fraksi minyak C yaitu sitronelal (74,94%), diikuti linalool (20,13%), dan isopulegol (3,08%). Fraksi minyak D diperoleh sitronelal (84,86%), diikuti linalool (6,13%), dan isopulegol (4,35%), hasil yang sama juga diperoleh pada fraksi minyak E yaitu sitronelal (36,83%), diikuti isopulegol (2,09%) dan linalool (0,65%).

Tabel 5.4. Komposisi fraksi minyak jeruk purut

No	Nama Senyawa	Persentase komponen (%)				
		Fraksi A	Fraksi B	Fraksi C	Fraksi D	Fraksi E
1.	Sabinen	19,83	-	-	-	-
2.	β -Pinen	6,99	2,38	-	-	-
3.	β -Micren	7,69	4,14	-	-	-
4.	Cis-Ocimen	1,48	1,24	-	-	-
5.	γ -Terpinen	3,00	2,73	-	-	-
6.	Limonen	4,38	3,1	-	-	-
7.	β -Ocimen	7,00	6,92	-	-	-
8.	α -Tujen	0,63	-	-	-	-
9.	α -Pinen	2,27	-	-	-	-
10.	2-Caren	-	1,26	-	-	-
11.	α -Terpenilona	1,1	1,23	-	-	-
12.	Linalool	8,17	12,94	20,13	6,13	0,65
13.	Sitronelal	32,48	50,65	74,94	84,86	36,83
14.	Isopulegol	1,26	1,85	3,08	4,35	2,09
15.	4-Terpeneol	0,64	0,79	1,85	2,3	7,16
16.	α -Terpinene	2,18	-	-	-	-
17.	Cis linalool oxide	0,89	1,06	-	-	-
18.	β -Phelandrene	-	9,00	-	-	-
19.	2,6-Dimethyl Hept-5-En-1-Al	-	0,69	-	-	-
20.	5,9-Dimethyl-1-decanol	-	-	-	1,97	-
21.	β -Sitronelol	-	-	-	-	1,28
22.	Capraldehyde	-	-	-	-	1,43
23.	Isopulegol	-	-	-	-	1,23
24.	α -terpineol	-	-	-	-	4,59
25.	Citral	-	-	-	-	1,7
26.	β -citronelol	-	-	-	-	12,27
27.	Linalil asetat	-	-	-	-	1,23
28.	4,8-Dimethylnona-1,7-Diene	-	-	-	-	0,99



29.	6-Octen-1-Ol, 3,7-Dimethyl-, Formate (CAS) Citronellyl Formate	4,10
30.	4-Hexen-2-One, 3,3-Diethyl-4,5-Dimethyl	0,24
31.	Bicycloelemene	1,27
32.	Citronellyl Acetate	5,22
33.	α -Cubebene	0,97
34.	α -Copaene	1,80
35.	β -Elemene	1,38
36.	β -Caryophyllene	4,86
37.	Citronella	0,57
38.	Diethyl Carbitol	0,27
39.	Thiogeraniol	1,28
40.	1,5,9-Decatriene, 2,3,5,8-Tetramethyl-	1,17
41.	Crotonsaeure	8,43
% Identifikasi		99,99 99,98 100 100,01 100,01

Keterangan: interval suhu: fraksi A (63,00 – 70,01^o C), fraksi B (71,30 – 70,80^o C), fraksi C (74,50 – 74,20^o C), fraksi D (74,20 – 74,00^o C) dan fraksi E (72,90 – 91,10^o C).

Komposisi minyak fraksi diperoleh sangat bervariasi, bervariasinya komposisi masing-masing fraksi minyak dapat dikarenakan komposisi masing-masing fraksi memiliki titik didih yang berbeda-beda. Hasil keseluruhan fraksi minyak yang selalu muncul yaitu sitronelal, linalool dan isopulegol. Komposisi ketiga komponen tersebut naik dengan bertambahnya fraksi penampung, hal tersebut dapat dikarenakan komponen sitronelal memiliki titik didih yang paling tinggi diikuti oleh linalool dan isopulegol, sehingga ketiga komponen diperoleh pada semua fraksi. Pada Tabel 5.4 juga diperoleh bahwa komposisi yang semakin sedikit pada fraksi A-E, hal tersebut dapat dikarenakan semakin tingginya penampung fraksi yang digunakan semakin tinggi pula titik didih komponen yang terkandung, sehingga semakin sedikit komponen yang diperoleh.



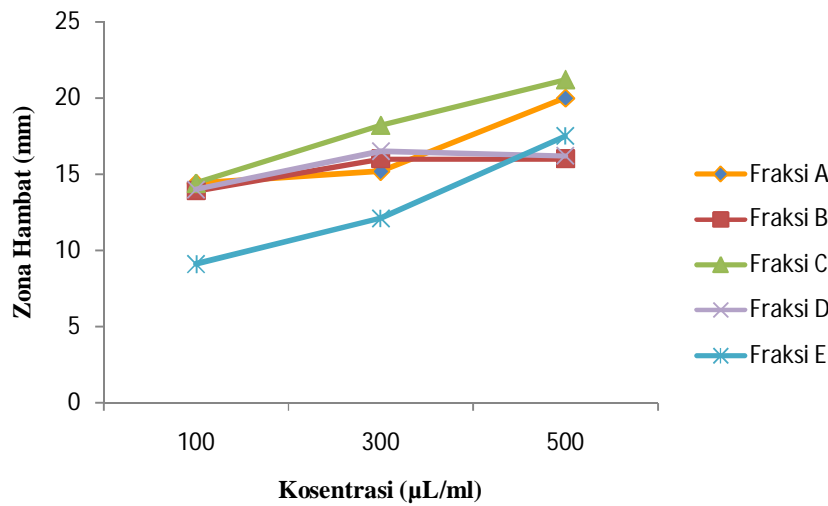
5.2.2. Penentuan Aktivitas Antibakteri Fraksi-Fraksi Minyak Jeruk Purut Terhadap Bakteri *E.coli*

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dengan metode difusi sumuran juga dilakukan pada kelima fraksi minyak. Pada metode ini juga dilihat aktifitas antibakteri dari kelima fraksi minyak pada konsentrasi yang sama pada minyak jeruk purut yaitu pada konsentrasi 100 $\mu\text{L/ml}$, 300 $\mu\text{L/ml}$, dan 500 $\mu\text{L/ml}$. Besarnya zona hambat juga dikategorikan menggunakan kategori David and Stout (1971). Besarnya zona hambat dari kelima fraksi minyak dapat dilihat pada Lampiran 7, sedangkan rata-rata zona hambat dari kelima fraksi minyak dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Rerata hasil zona hambat dari fraksi minyak jeruk purut

Sampel	Zona Hambat (mm)					
	Konsentrasi	100 $\mu\text{L/ml}$	Kategori	300 $\mu\text{L/ml}$	Kategori	500 $\mu\text{L/ml}$
Fraksi A	14,4	Kuat	15,2	Kuat	20,0	Kuat
Fraksi B	13,9	Kuat	16,0	Kuat	16,0	Kuat
Fraksi C	14,4	Kuat	18,2	Kuat	21,2	Sangat Kuat
Fraksi D	14,0	Kuat	16,5	Kuat	16,2	Kuat
Fraksi E	9,1	Lemah	12,1	Kuat	17,5	Kuat

Tabel 5.5 diperoleh bahwa kelima fraksi minyak menghasilkan zona hambat, hal ini menandakan kelima fraksi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli*. Aktivitas antibakteri kelima fraksi menghasilkan zona hambat yang bervariasi, hal tersebut ditunjukkan dengan semakin bertambahnya konsentrasi menunjukkan kecenderungan rata-rata zona hambat yang meningkat pula. Kecenderungan tersebut dapat dikarenakan pengaruh besarnya konsentrasi yang mempengaruhi besarnya rata-rata zona hambat yang ditunjukkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Pengaruh konsentrasi terhadap zona hambat

Gambar 5.3 diperoleh bahwa aktivitas antibakteri pada fraksi minyak C menunjukkan aktivitas zona hambat yang paling tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa komponen penyusun minyak fraksi C memiliki komponen penyusun utama yaitu sitronelal. Komponen sitronelal sendiri telah diketahui sebagai agen aktivitas antibakteri yang baik, hal tersebut dikarenakan perubahan struktural gugus -OH pada terpen yang memainkan peran penting dalam aktivitas antimikroba, dimana terpen teroksidasi menyebabkan kebocoran membrane permeabilitas (Griffin, Wylie dan Markham *et al.*, 2005).

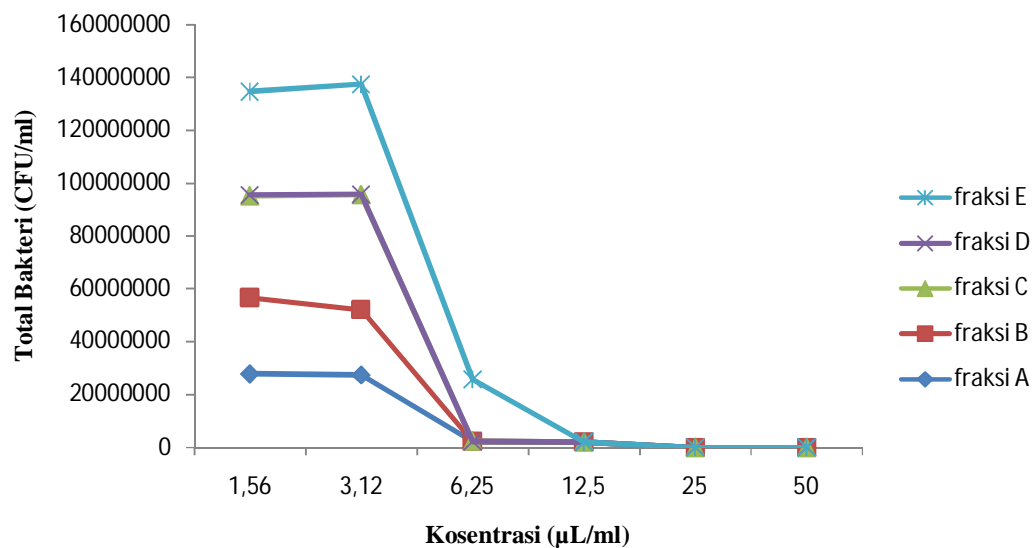
Perlakuan metode dilusi juga dilakukan untuk menentukan aktivitas antibakteri yang baik pada konsentrasi rendah yang ditunjukkan dengan tidak terdapat pertumbuhan bakteri *E.coli*. Hasil uji metode dilusi pada kelima sampel fraksi minyak dapat dilihat pada Lampiran 8, sedangkan rata-rata total pertumbuhan koloni bakteri dari masing-masing fraksi minyak dapat disajikan pada Tabel 5.6.



Tabel 5.6 Hasil pertumbuhan bakteri dari fraksi minyak jeruk purut

Sampel	Pertumbuhan bakteri (CFU/ml)					
	50 µL/ml	25 µL/ml	12,5 µL/ml	6,25 µL/ml	3,12 µL/ml	1,56 µL/ml
Fraksi A	2.10 ¹	2.10 ¹	2.1.10 ⁶	2.3.10 ⁶	27.10 ⁶	27.10 ⁶
Fraksi B	2.7.10 ²	2.1.10 ³	2.4.10 ³	2.8.10 ⁴	24.10 ⁶	28.10 ⁶
Fraksi C	0	1.3.10 ³	2.2.10 ³	1.10 ²	43.10 ⁶	38.10 ⁶
Fraksi D	0	4.10 ³	3.3.10 ³	2.7.10 ³	3.8.10 ⁴	2.6.10 ⁵
Fraksi E	1.0.10 ³	3.5.10 ²	2.4.10 ⁴	23.10 ⁶	41.10 ⁶	39.10 ⁶

Tabel 5.6 menunjukkan bahwa fraksi minyak A pada konsentrasi 50 µL/ml masih terdapat pertumbuhan bakteri tetapi dalam jumlah yang semakin kecil, begitu pula pada sampel fraksi minyak B. Pada sampel fraksi minyak C diperoleh konsentrasi 50 µL/ml tidak terdapat pertumbuhan bakteri, begitu pula pada sampel minyak fraksi D. Fraksi minyak E pada konsentrasi 50 µL/ml masih ditemukan pertumbuhan bakteri. Kecenderungan konsentrasi dengan pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4 Jumlah koloni bakteri fraksi minyak jeruk purut



Gambar 5.4 diperoleh bahwa dengan semakin bertambahnya konsentrasi, koloni yang tumbuh juga semakin sedikit. Hal tersebut dikarenakan semakin bertambahnya volume yang digunakan, semakin besar pula komponen aktif yang terkandung dalam minyak, sehingga bakteri yang terbunuh juga semakin besar (Parekh *et al*, 2007). Penyebab lain tidak terdapat pertumbuhan bakteri dapat dikarenakan komponen utama penyusun minyak yang berbeda-beda. Minyak fraksi C dan D pada konsentrasi 50 $\mu\text{L}/\text{ml}$ diperoleh tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Hal tersebut dapat dikarenakan komopone utama penyusun minyak yang merupakan komponen sitronelal, linalool, dan isopulegol. Komponen penyusun tersebut telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri terutama sitronelal yang berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri (Chantanpon, 2008).

5.3.Korelasi Rasio Monoterpenoid Hidrokarbon dan Teroksigenasi dengan Aktivitas Antibakteri

Hasil minyak atsiri jeruk purut dari daun (MJP-D), ranting (MJP-R), dan kulit buah (MJP-KB) maupun fraksi minyak A, B, C, D dan E diperoleh memiliki aktivitas antibakteri. Aktivitas tersebut tidak terlepas dari komponen penyusun fraksi dan minyak atsiri jeruk purut. Komposisi utama penyusun minyak jeruk purut telah diketahui senyawa monoterpenoid teroksigenasi (MO) dan hidrokarbon (MH). Komposisi tersebut dapat dikaitkan dengan aktivitas antibakteri terutama pada bakteri *E.coli*.

Komposisi penyusun minyak atsiri jeruk purut berdasarkan pembahasan diatas diperoleh bahwa diantara ketiga minyak jeruk purut yaitu MJP-D, MJP-KB dan MJP-R menghasilkan aktivitas yang berbeda. Aktivitas yang paling bagus



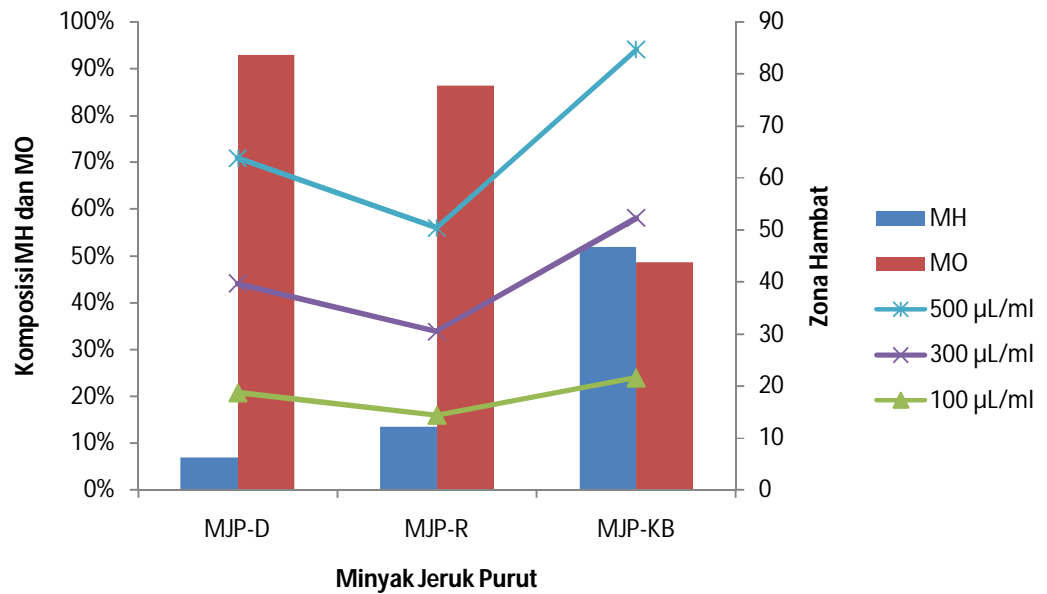
diperoleh pada MJP-KB, dengan rata-rata zona hambat sangat kuat pada ketiga konsentrasi. Hal tersebut dapat dikarenakan komponen utama penyusun minyak seperti β -pinen dan limonene yang merupakan senyawa monoterpenoid hidrokarbon (MH) dan sitronelal yang merupakan senyawa monoterpenoid teroksigenasinya (MO). Komposisi monoterpenoid hidrokarbon (MH) maupun teroksigenasi (MO) pada MJP-D dan MJP-R diperoleh sitronelal dan linalool yang merupakan senyawa MO diikuti oleh sabinen yang merupakan MH. Komponen MH dan MO pada ketiga minyak dengan aktivitas antibakterinya yang ditunjukkan pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7 Komposisi MH dan MO pada Minyak Jeruk Purut dengan Aktivitas Antibakteri

Sampel	Persentase MH & MO (%)		Rasio MH:M O	Zona hambat		
	MH	MO		100 μ L/ml	300 μ L/ml	500 μ L/ml
MJP-D	7,02	92,94	1 : 13	18,7	21,0	24,1
MJP-R	13,67	86,34	1 : 6	14,4	16,1	19,9
MJP-KB	52,01	48,61	1 : 1	21,6	30,7	32,4

Keterangan: MJP-D: Minyak jeruk purut daun, MJP-R: Minyak jeruk purut ranting, MJP-KB: Minyak jeruk purut kulit buah, MH: Monoterpen Hidrokarbon, MO: Monoterpen Teroksigenasi

Tabel 5.7 diperoleh bahwa komposisi MO 13 kali lebih tinggi dari MH pada MJP-D, dan pada MJP-R diperoleh komposisi MO lebih tinggi 6 kali dari MH. Kecenderungan yang berbeda ditunjukkan pada MJP-KB dengan komposisi MH dan MO yang hampir seimbang. Komposisi MH dan MO yang bervariasi menghasilkan aktivitas yang berbeda pula, yang mana aktivitas yang paling bagus diperoleh pada MJP-KB. Kecenderungan aktivitas antibakteri yang dikorelasikan dengan komposisi MH dan MO juga dapat ditunjukkan pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5 Kecenderungan aktivitas antibakteri yang dikorelasikan dengan komposisi MH dan MO

Gambar 5.5 menunjukkan bahwa dari komposisi monoterpenoid teroksigenasi (MO) dari MJP-D, MJP-R menurun, sedangkan komposisi monoterpenoid (MH) menunjukkan kenaikan, namun aktivitas antibakteri menunjukkan penurunan. Komposisi MH dan MO yang sebanding pada MJP-KB menunjukkan kenaikan bahkan dengan rata-rata kategori sangat kuat. Hal tersebut dapat dikarenakan komponen MO dan MH memberikan kontribusinya terhadap aktivitasnya, komponen MO yang berkontribusi terhadap aktivitas antibakterinya yaitu sitronelal (Chanthaphon *et al*, 2008) linalool (Hussain *et al*, 2008), dan α -terpineol (Bakkali, Aeverbeck, Aeverbeck, & Idaomar, 2008), sedangkan pada MH yaitu β -pinen, α -pinen (Zhu *et al*, 2012) dan limonene (Bakkali *et al*, 2008;) juga berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri tersebut.



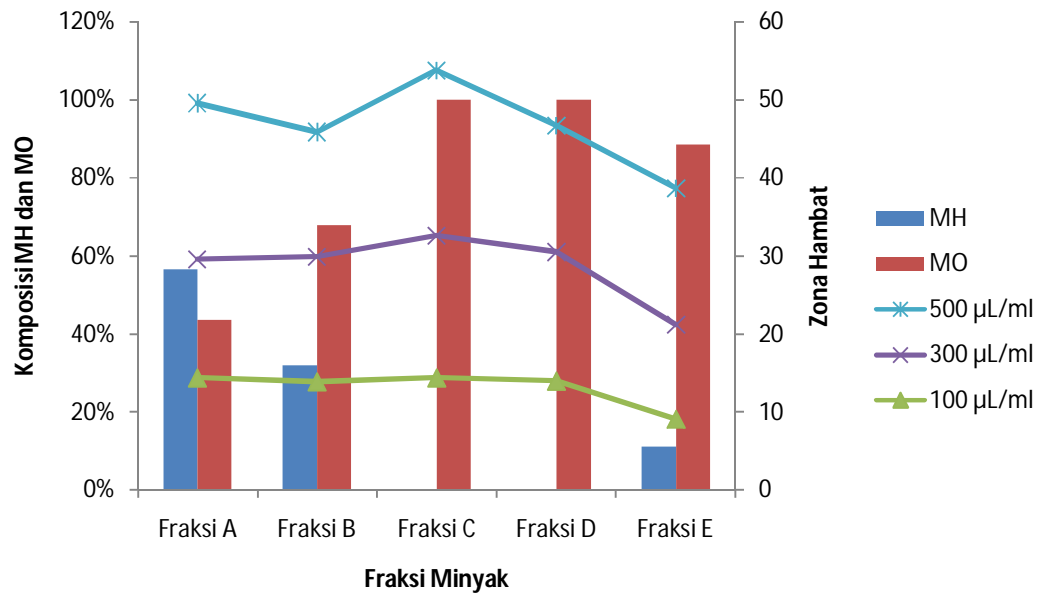
Aktifitas antibakteri yang sangat rendah pada MJR-R dapat dinaikkan aktifitasnya pada minyak fraksi. Komposisi MH dan MO pada kelima minyak fraksi terhadap aktifitas antibakterinya dapat ditunjukkan pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8 Komposisi MH dan MO pada kelima minyak fraksi terhadap aktifitas antibakteri

Sampel	Persentase MH & MO (%)		Rasio MH:MO	Zona Hambat		
	MH	MO		100 μ L/ml	300 μ L/ml	500 μ L/ml
Fraksi A	56,55	43,54	1:1	14,4	15,2	20,0
Fraksi B	32,00	67,99	1:2	13,9	16,0	16,0
Fraksi C	-	100	1:10	14,4	18,2	21,2
Fraksi D	-	100,01	1:10	14,0	16,5	16,2
Fraksi E	11,27	88,56	1:7	9,1	12,1	17,5

Keterangan: MJR-D: Minyak jeruk purut daun, MJR-R: Minyak jeruk purut ranting, MJR-KB: Minyak jeruk purut kulit buah, MH: Monoterpen Hidrokarbon, MO: Monoterpen Teroksigenasi

Tabel 5.8 menunjukkan bahwa komposisi kelima minyak fraksi mayoritas tersusun atas MO dengan komposisi penyusun yg lebih tinggi. Komposisi MO yang paling tinggi yaitu 10 kali dari MH ditunjukkan oleh fraksi minyak C dan D menunjukkan aktifitas yang hampir mirip. Aktifitas antibakteri pada fraksi C mengalami rata-rata dengan kategori sangat kuat dari pada pada fraksi minyak D dengan rata-rata yang kuat. Hasil aktifitas yang berbeda ditunjukkan pada fraksi minyak E dengan komposisi MO yang lebih rendah yaitu 7 kali lebih tinggi dari MH diperoleh aktifitas dengan rata-rata kategori kuat, hasil yang sama diperoleh pada fraksi minyak B dan fraksi minyak A. Kecenderungan aktivitas antibakteri dan korelasinya dengan komposisi MH dan MO yang dapat ditunjukkan oleh Gambar 5.6.

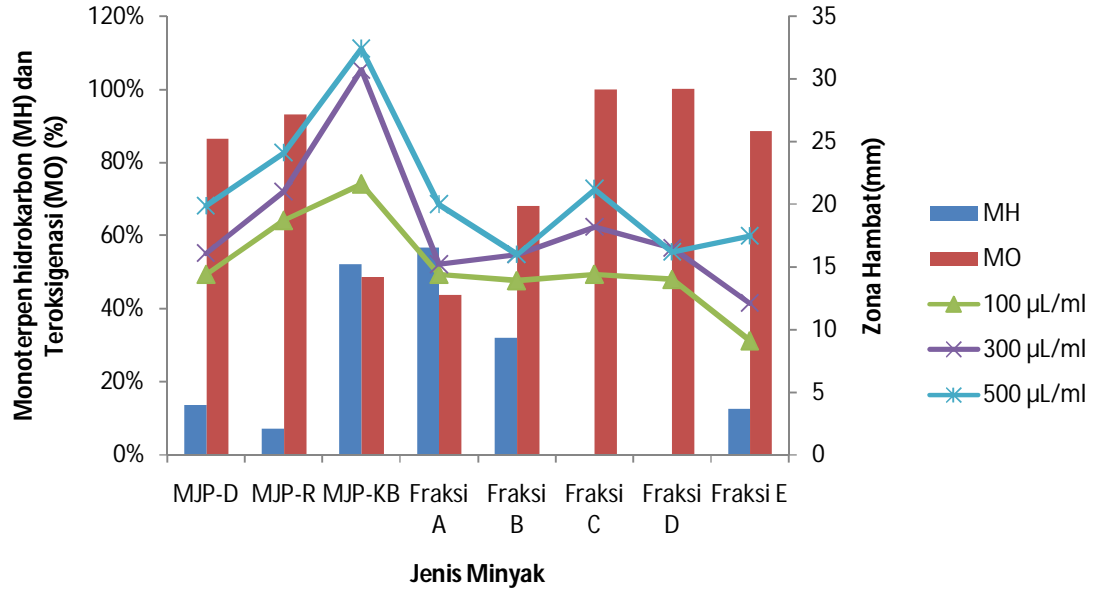


Gambar 5.6 Kecenderungan aktivitas antibakteri dan korelasinya dengan komposisi MH dan MO

Gambar 5.6 menunjukkan bahwa dengan semakin bertambahnya komposisi MO pada fraksi C dan D menunjukkan aktifitas yang berbeda. Hal tersebut dapat dikarenakan komposisi penyusun minyak C dan D memiliki komposisi yang berbeda, seperti sitronelal pada fraksi C diperoleh 74,94% sedangkan pada fraksi D diperoleh sitronelal 84,86%. Pada fraksi C diperoleh aktifitas yang lebih tinggi meskipun komposisi penyusun sitronelal lebih rendah dari fraksi minyak D. Hal ini dapat dikarenakan komponen lainya seperti linalool dan isopulegol yang memberikan kontribusinya terhadap aktivitas antibakteri, seperti isopulegol dan terpinene 4-ol (Burt *et al*, 2004). Penelitian yang sama sebelumnya dilaporkan oleh Barel (1991) komponen penyusun seperti α -terpineol dan terpinene-4-ol dengan komposisi yang kecil pada minyak eucalyptus memberikan aktivitas antibakteri yang cukup bagus terhadap bakteri pernafasaan.



Aktifitas antibakteri pada keseluruhan minyak terhadap komposisi MH dan MO pada fraksi dan minyak jeruk purut dapat ditunjukkan Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Kecenderungan komposisi monoterpen hidrokarbon dan teroksigenasi terhadap aktivitas antibakteri

Gambar 5.7 menunjukkan bahwa antara fraksi dan minyak jeruk purut dengan komposisi MH dan MO yang sebanding menunjukkan aktivitas antibakteri yang berbeda, hal tersebut ditunjukkan oleh MJP-KB dan fraksi minyak A. Aktifitas yang berbeda dapat dimungkinkan karena MJP-KB memiliki senyawa MH (β -pinen (21,44%) dan limonene (12,59%)) dan MO (terpinene-4-ol (11,93%) dan α -terpineol (5,16%)) yang berkontribusi lebih terhadap aktivitas antibakteri. Fakta ini menunjukkan bahwa komponen MH dan MO memberikan efek yang sinergis terhadap aktivitas antibakteri *E.coli* (Marino *et al.*,2001; Giles *et al.*, 2010). Efek yang sinergis yang lainya juga ditunjukkan pada fraksi minyak C, yang mana komposisi minyak pada fraksi C mayoritas merupakan komponen MO seperti sitronela, linalool, isopulegol dan terpenene-4-ol. Komponen



sitronelal pada fraksi C dan D diperoleh bahwa fraksi D memiliki komponen sitronelal yang lebih tinggi dari pada fraksi C, namun aktivitas antibakteri fraksi C lebih tinggi dari pada fraksi D. Hal tersebut dapat dikarenakan komponen dengan komposisi yang lebih rendah memberikan perannya terhadap aktivitas antibakteri yang memberikan efek yang sinergis. Delaquis (2002) menyatakan bahwa interaksi antar komponen minyak atsiri yang cukup kompleks dengan aktivitas antibakteri hanya sedikit yang dapat mengetahui untuk memberikan efek aditif, sinergis ataupun antagonis.

Mekanisme aktivitas antibakteri pada minyak atsiri secara umum sulit untuk dijelaskan, namun beberapa kemungkinan mekanisme telah diusulkan, seperti sifat hidrofobik minyak yang mampu mempartisi ke dalam bagian lemak dari sel membrane dan menyebabkan kebocoran isi sel (Burt *et al*, 2004; Edris *et al*, 2007). Sifat minyak yang lainya seperti lipofilik, gugus fungsi, dan volatilitas minyak yang berhubungan dengan proses fofolipid bilayer, transport electron, translokasi protein, gradient ions, fosforilasi dan reaksi enzim lainya, yang mana meningkatkan permeabilitas bakteri (Dorman dan Dean, 2000; Burt *et al*, 2004; Lambert *et al*, 2001). Oleh karena itu, aktivitas antibakteri tidak hanya ditentukan oleh komposisi senyawa MH dan MO tetapi juga beberapa faktor lain seperti volatilitas, hidrofobik, dan lipofilik dari minyak itu sendiri.

5.4. Analisis Data

Hasil analisis korelasi antara komposisi MH dengan aktivitas antibakteri pada masing-masing konsentrasi dapat ditunjukkan pada Lampiran 12. Korelasi antara MH dengan aktivitas antibakteri pada konsentrasi 100, 300, dan 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$



masing-masing sebesar 0,389; 0,428; dan 0,400. Ketiga nilai r diperoleh nilai yang positif, yang menandakan jika nilai MH besar maka aktivitas yang diperoleh juga semakin besar. Namun nilai probabilitas pada ketiga aktivitas antibakteri diperoleh $> 0,05$ yang menandakan tidak terdapat korelasi yang signifikan pada komposisi MH dengan aktivitas antibakterinya.

Korelasi lainnya yaitu komposisi MO dengan aktivitas antibakteri juga ditunjukkan pada Lampiran 5. Korelasi antara MO pada masing-masing konsentrasi diperoleh nilai $r = -0,396; -0,398; -0,449$. Ketiga nilai r diperoleh hasil negative yang menandakan jika nilai MO besar maka aktivitas antibakterinya semakin kecil. Nilai probabilitas yang diperoleh dari ketiga aktivitas antibakteri $> 0,05$ yang menandakan tidak terdapat korelasi yang signifikan antara komposisi MO dengan aktivitas antibakteri.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

4. Minyak jeruk purut daun (MJP-D), ranting (MJP-R) dan kulit buah (MJP-KB) memiliki aktivitas antibakteri *E.coli*. Zona hambat dengan kategori sangat kuat diperoleh pada MJP-KB konsentrasi 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ dan hasil MIC pada konsentrasi 6,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ tidak ada pertumbuhan bakteri.
5. Fraksi minyak atsiri jeruk purut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli*. Zona hambat dengan kategori sangat kuat diperoleh pada fraksi C konsentrasi 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ dan hasil MIC pada konsentrasi 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ tidak ada pertumbuhan bakteri.
6. Tidak terdapat korelasi yang signifikan antara komposisi MH dan MO pada minyak atsiri jeruk purut dan fraksi-fraksi minyak atsiri jeruk purut terhadap aktivitas antibakteri *E.coli*. Aktivitas antibakteri ditentukan oleh masing-masing komponen penyusun yang berkontribusi terhadap aktivitas tersebut.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme antibakteri pada pada komponen minyak atsiri jeruk purut.
2. Perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri lainya agar dapat digunakan sebagai perbandingan komponen aktif yang berperan sebagai antibakteri lainya.



DAFTAR PUSTAKA

- Adams RP. 2001. Identification of Essential Oils components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. USA: Allured Publishing Corporation.
- Aggarwal K.K., Khanuja S.P.S., Ahmad A., Kumar T.R.S., Gupta V.K., Kumar S. 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 59–63
- Akiyoshi, A., Kenichi, A., Toshiya, S., 1990. The Chemical Composition of Citrus Hystrix DC. (Swingi). *J. Essent. Oil Res*, 2:179-183.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological Effects of Essential Oils – A Review. *Food Chem. Toxicol*, 46 (2):446-475.
- Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants: Essential Oils, 2nd ed.* New York:Lavoisier Publishing:461-780.
- Burt, S. 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications In Foods—a Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223-253.
- Chanthaphon, S, Suphitchaya C, and Tipparat H. 2008. Antimicrobial Activities of Essential Oils and Crude Extracts from Tropical Citrus Spp. Against Food-Related Microorganisms. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 30 (1): 125-131
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T., de Hermans, T., et al. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 213–220.
- Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev*, 12:564-582
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martin-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., et al. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161:372-382
- Davis, W.W. dan Stout, T.R. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Journal Microbiology*, 22 : 659-665.
- Dobre, Alina A, Valeria G, Niculita P. 2011. Antimicrobial Activity Of Essential Oils Against Food-Borne Bacteria Evaluated By Two Preliminary Methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (6):119-125



Donato, Rosa, Francesca Santomauro, Anna Rita Bilia, Guido Flamini, Cristiana Sacco. 2015. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 64:1251-1254

Doreen S.H. NG, Laili C. Rose, Hamdan .S, Habsah .M, M.Z. H. Rozain dan Mariam .T. 2011. Preliminary Evaluation on The Antibacterial Activities of Citrus Hystrix Oil Emulsions Stabilized by Tween 80 and Span 80. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2):209-211.

Dormans, H.J.D.; Deans, S.G, 2000, Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol*, 88:308-316

Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res*, 21 (4): 308-323.

Franz, C., dan Novak, J., 2010. Sources of essential oils. In: Bas, er, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group.

Gendy, Abdel .N.E., Michele .L, Linda .M, Fabrizio .B, Valentina V. E, Simona .N, Francesca .M, Saber .H, Elsayed .O, Luisa .P, 2015. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Wild and Cultivated *Origanum Syriacum* Plants Grown in Sinai, Egypt. *Industrial Crops and Products*, 67:201-207.

Griffin, G.S., Markham, L.J. Leach, N.D. 2000. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Ess. Oil Res.*, 12:149-255

Gyawali, R., & Ibrahim, S.A. 2014. Natural Products as Antimicrobial Agents. *Food Control*, 46:412-429

Guenthers, Ernest. 1990. *Minyak Atsiri. Jilid 1. Ketaren* (penerjemah). UI Press, Jakarta

Harrewijn, P., van A.M. Oosten, and P.G.M. Piron, 2001. *Natural Terpenoids as Messengers*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Höferl M., Buchbauer G., Jirovetz L., Schmidt E., Stoyanova A., Denkova Z., Slavchev A. & Geissler M. 2009. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 21(5): 459-464.

Hussain, A.I., Anwar, E., Hussain Sherazi, S.T., and Przybylski, R. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum*



basilicum) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3):986-995.

Jawetz, E.A. dan Adelberg. 1995. *Mikrobiologi Kedokteran Diterjemah oleh Edi Nugroho dan Maulany*. Jakarta:CV. EGC.

Jawetz, Melnick dan Adelberg. 2010. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 25*. Jakarta:Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Karsinah, Moehario, L.H., Suharto, and Mardiasuti. 2010. Batang Negatif Gram,dalam Saputra, L (Editor), *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi*, Tangerang:Binarupa Aksara Publisher.

Khasanah, Lia .U, Kawiji, Rohula Utami, Yoga M.A. 2015. Pengaruh Perlakuan Pendahuluan Terhadap Karakteristik Mutu Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 4 (2):48-55.

Knoblach K., Pauli A., Iberi B., Wegand H., Weis N. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1: 119-128.

Kotan, .R, Saban .K., dan Ahmet C. 2007. Screening of Antibacterial Activities of Twenty-One Oxygenated Monoterpenes. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen*, 62 (7-8):507-513.

Lambert, R.J.W.,Skandamis,P.N.,Coote,P.J.,&Nychas,G.J.E. 2001. A Study of The Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil,Thymol and Carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462.

Mohamed, A.R., Sallam, Y.I., El-Leithy, A.S., Aly, S.E., 2012. Lemongrass(*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Ann. Agric.Sci*, 57:113-116.

Nascimento, G.G.F., Juliana .L, Paulo C. F, Giuliana L. S. 2000. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibioticresistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:247-256.

Nickavar, B., Mojab, F., and Dolat-Abadi, R., 2004, Analysis of Essential Oil of Two *Thymus* Species from Iran. *J. Food Chemistry*, 90:609-611

Niculae, M., Marina S., Carmen D.S, F. Brudască, D. Cadar, Bianca S., I. Scurtu, P. Bolfă, C.I. Mates, 2009. Antimicrobial Potential Of Some Lamiaceae Essential Oils Against Animal Multiresistant Bacteria. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*, 42 (1):170-175.

Nikolić, M, Jasmina Glamočlija, Isabel C.F.R. Ferreirab, Ricardo C. Calhελhab,Ángela Fernandesb, Tatjana Markovi cc, Dejan Markovi cd,



Abdulhamed, Giwelie, Marina Soković, 2014, Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52:183– 190

Nor, O. Muhammad. 1999. Volatile aroma compounds in *Citrus hystrix* oil. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.*, 27(2): 225–229.

Nychas, G.-J.E & Tassou, C.C. 1999. Preservatives Traditional Preservatives—Oils and Spices. In: R. Richard (Ed.), *Encyclopedia of food microbiology* (1717-1722). Oxford: Elsevier.

Oktavia, Gebby A. E., Muslimin Ibrahim, Lisa Lisdiana, 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*) terhadap Penghambatan Pertumbuhan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Cakram. *Lentera Bio*, 2 (3): 239-243.

Pelczar, M dan Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi (jilid 1)*. UI Press. Jakarta.

Pelczar, M dan Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi (jilid 2)*. UI Press. Jakarta.

Safaatul Munawaroh & Prima Astuti handayani. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) Dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana. *Jurnal Kompetensi Teknik*, 2 (1):73-78.

Sarikurkcu, C., Gokhan Zengin, Mustafa Oskay, Sengul Uysal, Ramazan Ceylan, Abdurrahman Aktumsek. 2015. Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Enzyme Inhibition Activities of Two *Origanum Vulgare* Subspecies (Subsp. *Vulgare* And Subsp. *Hirtum*) Essential Oils. *Industrial Crops and Products*, 70 : 178-184.

Science Daily. January 31th, 2008. *E. Coli Bacteria: A Future Source Of Energy?* (Online). (<https://www.sciencedaily.com/releases/2008/01/080129170709.htm>. accessed on february 15th, 2016)

Souza, C.A.S., Avancini, C.A.M., Wiest, J.M., 2000. Atividade Antimicrobiana *Detagetes Minuta* L.—*Compositae* (Chinchilho) Frente a Bacterias Gram-Positivase Gram-Negativas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 37 (6):429-433.

Sjölund, M, S. Bengtsson, J. Bonnedahl, J. Hernandez, B. Olsen and G. Kahlmeter. 2009. Antimicrobial Susceptibility in *Escherichia Coli* of Human and Avian Origin—A Comparison of Wild-Type Distributions. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 (5): 461-465.

Srisukh, V, Chanwit Tribuddharat, Veena Nukoolkarn, Nuntavan Bunyaphrapsara, Kulkanya Chokephaibulkit, Siwimol Phoomniyom, Sirirat Chuanphung, Somporn Srfuengfung. 2012. Antibacterial Activity of Essential Oils from



Citrus *Hystrix* (Makrut Lime) Against Respiratory Tract Pathogens. *Short Report, Science Asia*, 38; 212-217.

Srisukh, V., N. Bunyapraphatsara, A. Pongpan, W. Tungrugsasut, S. Puttipipatkachorn, W. Oniam, T. Karawamitr, S. Bunsiriluk, and W. Thongbainoi. 2012. Fresh Produce Antibacterial Rinse from Kaffir Lime Oil. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39 (2):15-27.

Sutthanont, N., Wej Choochote, Benjawan Tuetun, Anuluck Junkum, Atchariya Jitpakdi, Udom Chaithong, Doungnat Riyong, and Benjawan Pitasawat. 2010. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Edible Plant-Derived Essential Oils Against The Pyrethroid-Susceptible and -Resistant Strains of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 35 (1): 106-115.

Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G.V., Zeytinoglu, H.S., Vural, N., 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food Chem. Toxicol.*, 48:3274–3280.

Vargas, A.C., De Loguercio, A.P., Witt, N.M., Viana, L.R. 2004. Atividade Antimicrobiana In Vitro De Extrato Alcólico De Própolis. *Ciência Rural*, 34 (1):159-163.

Varahalarao, V., Kaladhar, D.S.V.G.K., 2012. Antimicrobial study of plant extracts of *Datura metel* L. against some important disease causing pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, S94– S97.

Vieira, R.F. and J.E. Simon. 2000. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. *Econ. Bot.*, 54: 207-216.

Viteri, L.O., Faroni, L.R.A., Oliveira, E.E., Pimentel, M.A., Silva, G.N., 2014. Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* say, in small storage units. *Ind. Crop. Prod.*, 56: 27–34.

Warsito, Noorhamdani A.S, Sukardi, Suratmo. 2013. *Chemical Compositions and Antioxidant Activity of Fraction and Kaffir Lime (Citrus Hystrix) Oils*. Laporan Unggulan Universitas Brawijaya.

Zhu, L, Y.J Tian, Y.C Yin and S.M. Zhu, 2012, Chemical Composition And Antimicrobial Activities Of The Essential Oils From Flowers, Leaves, And Stems Of *Wedelia Urticifolia*, *Ital. J. Food Sci.*, 2 :19-25