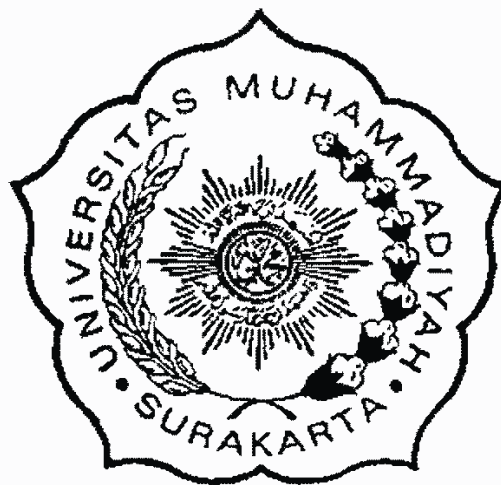


**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**  
**MINYAK ATSIRI DAUN JERUK KEPROK (*Citrus nobilis* Lour.)**  
**TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli***

**SKRIPSI**



Oleh:

**ANDRIAN NUR WIDYARTO**

**K 100 050 165**

**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA**  
**SURAKARTA**

**2009**

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Manusia hidup di alam selalu kontak dengan mikroorganisme, bakteri, virus, fungi, dan berbagai bentuk kehidupan parasit. Infeksi terjadi bila mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh menyebabkan berbagai gangguan fisiologi normal tubuh sehingga timbul penyakit infeksi. Penyakit infeksi mempunyai kemampuan menular pada orang lain yang sehat sehingga populasi penderita dapat meluas (Wattimena dkk., 1991).

Infeksi merupakan penyakit yang sering terjadi di daerah tropis seperti Indonesia karena keadaan udara yang banyak berdebu, temperatur yang hangat dan lembab sehingga mikroba dapat tumbuh subur. Bagi negara berkembang timbulnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik pada penyakit infeksi merupakan masalah penting. Kekebalan bakteri terhadap antibiotik menyebabkan angka kematian semakin meningkat. Penanganan penyakit infeksi tersebut tidak hanya meningkatkan biaya kesehatan karena diperlukan penanganan kombinasi antibiotik, tetapi juga menyebabkan meningkatnya kematian terutama di negara berkembang karena antibiotik yang diperlukan tidak tersedia (Heymann, 1996).

Penyakit infeksi masih menduduki urutan pertama dalam hal penyebarannya di Negara Indonesia, sehingga dibutuhkan biaya penanggulangan yang relatif besar terutama untuk obat-obat golongan antibiotik. Dana yang harus dikeluarkan oleh

pemerintah Indonesia untuk mengimpor bahan baku antibiotik setiap tahunnya berkisar antara Rp. 18,6 – Rp. 122,4 milyar (Akmal, 1996).

*Staphylococcus aureus* merupakan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia dan paling sering terjadi. Strain *Staphylococcus aureus* yang ditemukan di rumah sakit mungkin resisten terhadap penisilin karena mampu menghasilkan penisilinase yang merusak penisilin dan dapat menjadi resisten terhadap obat-obat lain. Sebagai penyebab infeksi stafilocokus “rumah sakit” *Staphylococcus aureus* bertanggung jawab atas separo kasus sepsis pada luka bedah, pada unit kebidanan menyebabkan abses payudara pada ibu-ibu, mata lengket dan lesi-lesi kulit pada bayi, ratusan kematian setiap tahun di Inggris karena infeksi stafilocokus yang terjadi di rumah sakit. Penyebaran *Staphylococcus aureus* ke dalam udara biasanya sering terjadi. Laki-laki lebih sering menyebarkan bakteri ini daripada wanita dan kulit di daerah perineum, merupakan sumber utama, sedangkan *Escherichia coli* merupakan flora normal di dalam usus. *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi saluran kencing yang merupakan infeksi terbanyak (80%), gastroenteritis, dan meningitis pada bayi, peritonitis, infeksi luka, kolesistitis, syok bakteremia karena masuknya organisme ke dalam darah dari uretra, kateterisasi atau sistoskopi atau dari daerah sepsis pada abdomen atau pelvis (Gibson, 1996).

Minyak atsiri adalah suatu substansi alami yang telah dikenal memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Bahkan minyak atsiri cengkeh telah digunakan sejak lama di berbagai rumah sakit Eropa untuk mengatasi infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Yulliasri dkk., 2000). Minyak atsiri dapat menghambat beberapa jenis

bakteri merugikan seperti *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, dan *Pasteurella* (Agusta, 2000). Jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.) merupakan salah satu tumbuhan yang menghasilkan minyak atsiri. Tanaman ini dilaporkan bahwa daun, akar, dan kulit buahnya mengandung alkaloid dan polisakarida. Disamping itu daun dan akarnya juga mengandung flavonoid, sedangkan daun dan kulit buahnya mengandung minyak atsiri serta akar dan kulit buahnya mengandung saponin (Hutapea, 1993). Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, minyak atsiri yang diperoleh dari hasil penyulingan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Normasani, 2007).

Sejauh ini belum ditemukan literatur yang melaporkan tentang aktivitas antibakteri dari minyak atsiri daun jeruk keprok, maka akan dilakukan penelitian dengan judul “Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Keprok (*Citrus nobilis* Lour.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*”.

## **B. Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Apakah minyak atsiri daun jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan berapa Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) nya?
2. Komponen minyak atsiri apa yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*?

### C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) nya.
2. Untuk mengetahui komponen minyak atsiri yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

### D. Tinjauan Pustaka

#### 1. Jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.)

##### a. Sistematika tumbuhan

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Geraniales
Suku	: Rutaceae
Marga	: Citrus
Jenis	: <i>Citrus nobilis</i> Lour.
Nama umum/dagang	: jeruk keprok
Nama Daerah	: jeruk keprok (Melayu), jeruk keprok (Jawa), jeruk jepun atau jeruk keprok (Sunda), jeruk keprok (Madura).

(Hutapea, 1993)

**b. Morfologi tumbuhan**

Tanaman jeruk keprok mempunyai tinggi 2-8 m, tangkai daun bersayap sangat sempit sampai boleh dikatakan tidak bersayap, dan panjang 0,5-1,5 cm. Helai daun tanaman jeruk keprok bulat telur memanjang, elliptis atau bentuk lanset, dengan ujung tumpul, melekok ke dalam sedikit, tepi bergerigi beringgit sangat lemah, panjang 3,5-8 cm. Diameter bunga 1,5-2,5 cm. Daun mahkota putih, bentuk buah seperti bola tertekan, panjang 4-7 cm, diameter 5-8 cm, tebal kulit 0,2-0,3 cm, dan daging buah berwarna oranye (Van Steenis, 1997).

**c. Khasiat dan kegunaan**

Manfaat jeruk keprok untuk terapi antara lain untuk pertahanan tubuh, antikanker, memerangi infeksi virus, dan menurunkan kadar kolesterol. Konsumsi jeruk dan jus jeruk dapat melindungi tubuh terhadap serangan kanker, membantu sistem pertahanan, membantu memerangi infeksi virus. Selain mengandung vitamin C dan flavonoid, jeruk juga mengandung cukup banyak pektin, kalsium, dan asam folat. Vitamin C dan flavonoid pada jeruk berperan sebagai antioksidan untuk meningkatkan kesehatan tubuh dan mencegah proses penuaan. Adapun kandungan pektinnya berfungsi untuk menurunkan kolesterol (Wirakusumah, 2002).

Minyak atsiri daun jeruk keprok bersifat menenangkan dan baik digunakan untuk perawatan kulit. Minyak atsiri daun jeruk keprok dapat digunakan sebagai campuran minyak gosok untuk sistem pencernaan bagi anak-anak dan juga dapat menghilangkan bekas luka (Agusta, 2000).

#### **d. Kandungan kimia**

Daun, akar, dan kulit buah *Citrus nobilis* mengandung alkaloid dan polisakarida. Disamping itu daun dan akarnya juga mengandung flavonoid, sedangkan daun dan kulit buahnya mengandung minyak atsiri serta akar dan kulit buahnya mengandung saponin (Hutapea, 1993).

## **2. Bakteri**

Bakteri adalah mikroorganisme bersel satu, berkembang biak dengan pembelahan diri dengan hanya dilihat dengan mikroskop (Jawetz dkk., 2001).

Pada pengecatan Gram bakteri digolongkan menjadi 2 golongan, yaitu :

### **a. Bakteri Gram positif**

Bakteri Gram positif adalah bakteri yang pada pengecatan Gram akan tahan terhadap alkohol, sehingga tetap mengikat warna cat pertama dan tidak mengikat warna cat kedua dan warna bakteri tetap berwarna ungu.

Contohnya adalah *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Pectostreptococcus*, *Mycobacteria*, *Bacillus*, *Clostridia*, *Staphylococcus* dan *Corynebacterium diphtheria* (Anonim, 1993).

### **b. Bakteri Gram negatif**

Bakteri Gram negatif adalah bakteri yang pada pengecatan Gram tidak tahan terhadap alkohol, sehingga warna cat yang pertama akan dilunturkan dan bakteri akan mengikat warna yang kedua yang diberikan sehingga bakteri tampak berwarna merah (Pelczar dan Chan, 1986). Contohnya adalah *Neisseria veillonella*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella*, dan *Escherichia coli* (Anonim, 1993).

Lapisan-lapisan pembungkus yang terletak antara selaput sitoplasmik dan simpai secara kolektif disebut dinding sel. Fungsi utama dinding sel adalah menyediakan komponen struktural kaku dan kuat yang dapat menahan tekanan osmosis yang tinggi dari kadar kimia tinggi ion anorganik dalam sel. Semua dinding sel bakteri mempunyai komponen struktural yang sama yang dinamakan mukopolisakarida dinding sel, peptidoglikan, dan asam teikhoat. Peptidoglikan merupakan polimer kompleks yang terdiri dari rangkaian asam N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat yang disusun secara berganti-ganti. Pada kuman Gram negatif, dinding selnya terdiri dari suatu lapisan peptidoglikan, lipoprotein, selaput luar dan polisakarida. Lipopolisakarida dinding sel Gram negatif terdiri dari suatu lipid yang kompleks, yang dinamakan lipid A. Lipid A terdiri dari suatu rantai satuan disakarida glukosamin yang dihubungkan dengan ikatan pirofosfat, tempat melekat sejumlah asam-asam lemak berantai panjang (Jawetz dkk., 2001).

**a. *Staphylococcus aureus***

Sistematika dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

Divisi : Protophyta  
 Kelas : Schizomycetes  
 Bangsa : Eubacteriales  
 Suku : Micrococcaceae  
 Marga : Staphylococcus  
 Jenis : *Staphylococcus aureus*

(Salle, 1961)



*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk bulat dengan diameter 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ . Kata *Staphyle* biasa dari bahasa Yunani yang berarti setangkai buah anggur, menyerupai susunan yang bergerombol dari kokus tersebut. Susunan yang bergerombol biasanya pada sediaan yang dibuat dari media padat, sedangkan sediaan dari media cair biasanya tersebar atau berderet seperti rantai pendek (Salle, 1961).

Bakteri ini mempunyai sifat dapat memfermentasikan manitol dan laktosa, bersifat proteolitik, menghasilkan enzim koagulase (suatu enzim yang dapat menyebabkan koagulasi sitrat pada plasma darah), menghasilkan pigmen yang berwarna keemasan, menghasilkan lipase, dapat menghemolisis agar darah secara aerobik, dan zona hemolisisnya luas serta dapat tumbuh pada media dengan kadar NaCl 10% (Frobisher dkk., 1974).

Beberapa *Staphylococcus* tergolong flora normal pada kulit dan selaput lendir manusia, *Staphylococcus* lainnya dapat menyebabkan keparahan pada luka, abses, bisul, dermatitis, meningitis dan sebagainya. *Staphylococcus aureus* dapat ditemukan pada kulit, saluran pencernaan, udara, makanan, air dan pakaian yang terkontaminasi. Bakteri ini mudah tumbuh pada kulit yang mengalami radang, kulit yang mengalami luka yang mengarah pada infeksi kulit dan proses-proses bernanah lainnya. Pada saluran pernafasan dapat menyebabkan infeksi intra abdomen yang dapat timbul karena komplikasi pasca bedah. Infeksi traktus urinarius dan infeksi traktus genitali pada wanita (Salle, 1961).

**b. *Escherichia coli***

Sistematika dari *Escherichia coli* adalah sebagai berikut :

Divisio	: Protophyta
Subdivisio	: Schizomycetea
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

(Salle, 1961)

*Escherichia coli* adalah kuman oportunitis yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak dan *travelers diarrhea*, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh yang lain di luar usus. Morfologi dari *Escherichia coli* adalah berbentuk batang pendek (koko basil) negatif Gram, ukuran 0,4-0,7  $\mu\text{m}$  x 1,4  $\mu\text{m}$ , sebagian gerak positif dan beberapa strain mempunyai kapsul. *Escherichia coli* tumbuh baik pada hampir semua media digunakan untuk isolasi kuman enterik, sebagian besar strain *Escherichia coli* tumbuh sebagai koloni yang meragi laktosa. *Escherichia coli* bersifat mikroaerofilik. Beberapa strain bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe beta (Karsinah dkk., 1994). Biakan *Escherichia coli* berupa koloni berwarna merah pada

agar Mac Conkey yang menunjukkan bahwa basil memfermentasi laktosa dan bersifat non patogen di dalam intestine (Gibson, 1996).

Tempat yang paling sering terkena infeksi *Escherichia coli* adalah saluran kemih, saluran empedu, dan tempat-tempat lain di rongga perut (Jawetz dkk., 2001). Bakteri ini juga menghasilkan enterotoksin penyebab diare. *Escherichia coli* memproduksi enterotoksin yang tahan panas dapat menyebabkan diare yang ringan, sedangkan enterotoksin yang tidak tahan panas dapat menyebabkan sekresi air dan klorida ke dalam lumen usus, menghambat reabsorpsi natrium (Volk dan Wheeler, 1990).

### **3. Aktivitas antibakteri**

#### **a. Antibakteri**

Antibakteri adalah suatu senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan maupun membunuh mikroorganisme (Jawetz dkk., 1986). Pelczar dan Chan (1986) mengatakan bahwa makin tinggi konsentrasi suatu zat antimikroba akan semakin cepat sel mikroorganisme terbunuh atau terhambat pertumbuhannya. Aktivitas antimikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, konsentrasi atau intensitas zat antimikroba, jumlah mikroorganisme, keasaman atau kebasaan (pH), potensi suatu zat antimikroba dalam larutan yang diuji, dan kepekaan suatu mikroba terhadap konsentrasi antibakteri (Pelczar dan Chan, 1986).

#### **b. Mekanisme kerja zat antibakteri**

Antibakteri obat atau senyawa kimia yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Berdasarkan sifat toksisitas

selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri, dikenal aktivitas bakteriostatik. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal dengan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkatkan kemampuan bakterisida. Aktivitas antibakteri dibagi dalam lima kelompok :

1) Antibakteri yang menghambat metabolisme sel bakteri

Pada mekanisme ini diperoleh efek bakteriostatik. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini adalah sulfonamide, trimetoprim, asam p-aminosalisilat dan sulfon. Kerja antibakteri ini adalah menghambat pembentukan asam folat, bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya dan bakteri memperoleh asam folat dengan mensintesis sendiri dari asam para amino benzoat (PABA). Sulfonamid dan sulfon bekerja bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat. Sedang trimetoprim bekerja dengan menghambat enzim dihidrofolat reduktase (Setiabudy dan Gan, 1995).

2) Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan, sintesis peptidoglikan akan dihalangi oleh adanya antibiotik seperti penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, sikloserin. Sikloserin akan menghambat reaksi paling dini dalam proses sintesis dinding sel sedang yang lainnya menghambat di akhir sintesis peptidoglikan, sehingga mengakibatkan dinding sel menjadi tidak sempurna dan tidak mempertahankan pertumbuhan sel secara normal, sehingga tekanan osmotik dalam

sel bakteri lebih tinggi daripada tekanan di luar sel maka kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada bakteri yang peka (Setiabudy dan Gan, 1995).

3) Antibakteri yang mengganggu membran sel bakteri

Sitoplasma dibatasi oleh membran sitoplasma yang merupakan penghalang dengan permeabilitas yang selektif. Membran sitoplasma akan mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar-masuknya bahan-bahan lain. Jika terjadi kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelczar dan Chan, 1986).

4) Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri

Kehidupan sel bakteri tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiah. Jika kondisi atau substansi yang dapat mengakibatkan terdenaturasinya protein dan asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi (denaturasi) yang bersifat irreversible terhadap komponen-komponen seluler yang vital ini (Pelczar dan Chan, 1986).

5) Antibakteri yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri

Protein, DNA, dan RNA berperan penting dalam proses kehidupan normal sel bakteri. Apabila terjadi gangguan pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Pelczar dan Chan, 1986).

c. Pengukuran aktivitas antibakteri

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu :

### 1) Dilusi cair dan dilusi padat

Pada prinsipnya antibiotik diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman dalam media, sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar lalu ditanami kuman atau ditanami bakteri dan diinkubasi lalu dibaca hasilnya (Anonim, 1993).

### 2) Difusi

Media yang digunakan adalah Mueller Hinton. Pada metode difusi ini ada beberapa cara, yaitu :

#### a) Cara Kirby Bauer

Koloni kuman diambil dan ditumbuhkan selama 24 jam pada agar, disuspensikan ke dalam 1 ml BHI cair, diinkubasi selama 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah aquades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi kuman  $10^8$  CFU per ml (CFU = *Colony Forming Unit*). Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi kuman lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah. Kapas lidi tersebut dioleskan pada permukaan media agar hingga rata dan diletakkan di atas samir (disk) yang mengandung antibiotik di atasnya, diinkubasi pada 37°C dan dibaca hasilnya.

Zona radikal adalah suatu daerah di sekitar disk, dimana sama sekali tidak ditemukan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal. Sedangkan zona irradikal adalah suatu daerah di sekitar disk yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang dihambat oleh antibiotik tersebut,

tetapi tidak dimatikan. Pada zona irradikal akan terlihat adanya pertumbuhan yang kurang subur atau jarang dibandingkan dengan daerah di luar pengaruh antibiotik tersebut.

b) Cara sumuran

Tahap awal sama dengan cara Kirby Bauer. Pada agar tersebut dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu menurut kebutuhan, ke dalam sumuran tersebut dimasukkan atau diteteskan larutan antibiotik yang digunakan. Agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, dibaca hasilnya seperti pada cara Kirby Bauer.

c) Cara Pour Plate

Tahap awal sama dengan cara Kirby Bauer. Satu mata ose bakteri diambil dengan menggunakan ose khusus dan dimasukkan dalam 4 ml agar base 1,5 % yang mempunyai temperatur 50°C. Setelah suspensi kuman tersebut dibuat homogen, kemudian dituang pada media Mueller Hinton agar dan ditunggu sebentar sampai agar tersebut membeku, kemudian disk antibiotik diletakkan dan dieramkan selama 15-20 jam dengan suhu 37°C. Suspensi kuman dibaca dengan disesuaikan standar masing-masing antibiotik.

(Anonim, 1993)

#### **4. Minyak atsiri**

Minyak atsiri adalah suatu zat yang berbau dan terdapat pada beberapa tanaman, karena mudah menguap bila dibiarkan terbuka pada suhu kamar maka disebut minyak menguap, minyak eteris atau minyak esensial. Pada umumnya minyak atsiri tidak dapat bercampur dengan air, larut dalam eter, alkohol, kebanyakan

larut dalam pelarut organik, bersifat optis aktif, memiliki indek bias tinggi, rotasi spesifik dan sering digunakan sebagai alat diagnostis (Claus dkk., 1970).

Secara kimia terpen minyak atsiri dapat dibagi dalam dua golongan, yaitu monoterpen dan seskuiterpen, berupa isoprenoid  $C_{10}$  dan  $C_{15}$  yang jangka titik didihnya berbeda (titik didih monoterpen 140-180°C, titik didih seskuiterpen >200°C). Secara ekonomi senyawa tersebut penting sebagai dasar wewangian alam dan juga untuk rempah-rempah serta sebagai senyawa citarasa dalam industri makanan (Harborne, 1987).

Minyak atsiri juga dapat sebagai antimikroba tetapi tidak semua minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Minyak atsiri bagi manusia terutama pada dosis yang tinggi atau berlebihan dapat menyebabkan depresi susunan syaraf yang disertai dengan gejala kejang dan kematian. Beberapa jenis minyak atsiri dapat digunakan sebagai bahan antiseptik eksternal dan internal, sebagai bahan analgetik, haemolitik, sedatif, stimulan untuk obat sakit perut dan sebagai obat cacing (Guenther, 1987).

Minyak atsiri pada umumnya mempunyai bau khas aromatik dan tidak berwarna, akan tetapi bila dibiarkan lebih lama maka warnanya akan berubah kecoklatan karena terjadi proses oksidasi. Untuk mencegah oksidasi, minyak atsiri disimpan pada tempat yang sejuk dan kering dalam wadah tertutup rapat. Umumnya minyak atsiri larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air (Claus dkk., 1970).

Sebagian besar minyak atsiri terdiri dari persenyawaan hidrokarbon isosiklik serta golongan hidrokarbon yang telah mengikat oksigen seperti alkohol, fenol, dan



lain-lain. Minyak atsiri mengandung bermacam-macam komponen kimia yang berbeda-beda dan dapat digolongkan ke dalam empat kelompok, yaitu terpena yang ada hubungannya dengan isopren, persenyawaan berantai lurus tidak mengandung rantai cabang, turunan benzen, dan bermacam-macam senyawa lain, misalnya turunan alkohol (linalool, borneol, sineol, eugenol), aldehyd (benzaldehyd, anisaldehyd, sitral), keton (kamfor, mentol, piperiton) (Guenther, 1987).

## **5. Destilasi Minyak Atsiri**

Metode yang digunakan untuk memperoleh minyak atsiri ada tiga macam, yaitu :

- a. Penyulingan : penyulingan dengan air, penyulingan dengan uap dan air, penyulingan dengan uap air langsung.
- b. Ekstraksi : ekstraksi dengan pelarut menguap, ekstraksi dengan lemak dingin, ekstraksi dengan lemak panas.
- c. Pemerasan, yaitu dilakukan bila minyak atsiri yang ada dalam bahan akan rusak bila terkena panas dan air (Guenther, 1987).

Ada beberapa faktor yang menentukan jumlah minyak yang dapat tersuling bersama-sama dengan air pada metode penyulingan, yaitu tekanan uap yang digunakan, berat molekul masing-masing komponen minyak dalam bahan dan kecepatan minyak keluar dari bahan (Ketaren, 1989).

## **6. Sterilisasi**

Hampir semua media pada tindakan yang dilakukan dalam diagnosa mikrobiologis, sterilitas sangat diutamakan baik alat-alat yang dipakai maupun medianya. Suatu alat atau bahan dikatakan steril bila bahan atau alat tersebut bebas

dari mikroba, baik dalam bentuk vegetatif maupun bentuk spora. Tindakan untuk membebaskan alat atau media dari jasad renik disebut dengan sterilisasi. Terdapat berbagai cara sterilisasi yang dikenal dan pemilihan cara sterilisasi tergantung dari bahan atau alat yang akan disterilisasi. Cara sterilisasi tersebut adalah dengan pemanasan, filtrasi, penyinaran dengan menggunakan sinar gelombang pendek (radiasi) atau dengan cara khemis (Anonim, 1993).

## **7. Media**

Media dapat dianggap sebagai kumpulan zat-zat organik dan anorganik yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri dengan syarat-syarat tertentu. Untuk mendapatkan suatu lingkungan kehidupan yang cocok bagi pertumbuhan bakteri, pembuatan media harus mempunyai syarat-syarat dalam :

### **a. Susunan makanan**

Dalam suatu media yang dipergunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri haruslah terdapat kandungan air, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, vitamin, dan garam.

### **b. Tekanan osmose**

Mengingat sifat-sifat bakteri juga sama seperti sifat-sifat sel yang lain pada umumnya terhadap tekanan osmose maka untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya bakteri membutuhkan media dalam keadaan yang isotonis. Apabila keadaan media tersebut hipotonis maka bakteri akan mengalami plasmoptysis, sedangkan bila media tersebut hipertonis maka bakteri akan mengalami plasmolisis.

c. Derajat keasaman

Pada umumnya bakteri membutuhkan pH sekitar netral. Namun bakteri tertentu membutuhkan pH sangat alkalis, yakni *Vibrio* membutuhkan pH antara 8-10 untuk pertumbuhannya yang optimal.

d. Temperatur

Untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimal bakteri membutuhkan temperatur tertentu. Umumnya bakteri yang patogen membutuhkan temperatur 37°C, sesuai dengan temperatur tubuh.

e. Sterilitas

Sterilitas media merupakan suatu syarat yang sangat penting. Media yang tidak steril tidak dapat digunakan untuk melakukan pemeriksaan mikrobiologis karena tidak dapat dibedakan dengan pasti apakah bakteri tersebut berasal dari material yang diperiksa ataukah hanya merupakan kontaminan.

(Anonim, 1993)

## **8. Kromatografi lapis tipis**

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fisika kimia. Lapisan yang memisahkan, yang terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam) ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang dipisah, berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Kemudian pelat ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak). Pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan), selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi. Diantara

berbagai jenis teknik kromatografi, kromatografi lapis tipis adalah yang paling cocok untuk analisis obat di laboratorium farmasi. Metode ini hanya memerlukan investasi yang kecil untuk perlengkapan, menggunakan waktu yang singkat untuk menyelesaikan analisis (15-60 menit), dan memerlukan jumlah cuplikan yang sedikit, kebutuhan ruangan minimal dan penanganannya sederhana (Stahl, 1991).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada kromatografi lapis tipis lebih baik dikerjakan dengan pereaksi kimia dan reaksi warna. Tetapi lazimnya untuk identifikasi menggunakan harga Rf meskipun harga Rf dalam kromatografi lapis tipis kurang tepat bila dibandingkan pada kromatografi kertas. Seperti halnya pada kromatografi kertas harga Rf didefinisikan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

Harga-harga Rf untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standard (Sastrohamidjojo, 2005). Sedangkan untuk pereaksi semprot atau bercak digunakan pada deteksi golongan senyawa tertentu, misalnya dalam tanaman yang banyak mengandung flavonoid menggunakan  $AlCl_3$  dan minyak atsiri menggunakan vanillin-asam sulfat (Markham, 1988).

## **9. Bioautografi**

Metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kromatografi kertas yang mempunyai aktivitas antibakteri, antifungi, antibiotik dan antiviral disebut bioautografi (Djie, 2003).

Bioautografi dapat juga digunakan untuk mendeteksi antibiotik yang belum diketahui metode yang sesuai (metode kimia atau fisika) yang terbatas untuk substansi yang murni. Sementara deteksi kimia dengan reaksi warna yang spesifik digunakan sebagai pembandingan hasil bioautografi, sehingga kedua metode tersebut saling melengkapi (Stahl, 1991).

Kromatogram diletakkan pada permukaan media agar didalam petri yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme yang sensitif untuk antibiotik yang akan dipelajari. Setelah diinkubasi selama 15-20 jam, pada temperatur kira-kira 37<sup>0</sup>C akan tampak zona yang bersih pada lapisan media agar yang ditempeli kromatogram sampel antibiotiknya berdifusi kelapisan tersebut dan pada media yang ditempeli kromatogram kontrol tidak menghambat pertumbuhan mikroorganisme, sehingga akan terlihat zona yang buram (Zweig dan Whittaker, 1971).

### **E. Landasan Teori**

Jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.) merupakan salah satu tumbuhan yang menghasilkan minyak atsiri, dilaporkan bahwa daun, akar, dan kulit buah *Citrus nobilis* mengandung alkaloid dan polisakarida. Disamping itu daun dan akarnya juga mengandung flavonoid, sedangkan daun dan kulit buahnya mengandung minyak atsiri serta akar dan kulit buahnya mengandung saponin (Hutapea, 1993). Minyak atsiri dapat menghambat beberapa jenis bakteri merugikan seperti *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, dan *Pasteurella* (Agusta, 2000). Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan oleh Normasani (2007), minyak atsiri

yang diperoleh dari hasil penyulingan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle.) memiliki aktivitas antibakteri dengan KBM terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 0,625% v/v dan *Escherichia coli* sebesar 1,25% v/v. Maka dilakukan pendekatan kemotaksonomi, karena berasal dari genus yang sama dengan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle.) yaitu Citrus, dimungkinkan bahwa minyak atsiri dari daun jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.) juga memiliki potensi antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

#### **F. Hipotesis**

Minyak atsiri daun jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.