



UJI AKTIVITAS MINYAK JERUK PURUT DARI DAUN, RANTING, DAN KULIT BUAH TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Bacillus cereus*

Activity Test of Essential Lime Oil of Leaves, Twigs, and Rind against *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*

Warsito^{1,*}, Nur Hidayat², dan Ayu Yasri Putri²

¹Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang, Indonesia 65145

²Jurusan Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang, Indonesia 65145

Untuk korespondensi: Tel/Fax (0341) 490152, e-mail: warsitoub88@yahoo.com

Received: June 22, 2017

Accepted: December 05, 2017

Online Published: December 31, 2017

DOI : 10.20961/jkpk.v2i3.11856

ABSTRAK

Telah dilakukan uji aktivitas minyak atsiri jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dari daun, ranting dan kulit buah terhadap pertumbuhan bakteri gram negatif *E. coli* dan gram positif *B. cereus*. Minyak atsiri jeruk purut diperoleh dengan cara distilasi uap-air dari daun, ranting dan kulit buah jeruk purut selama 5 jam. Analisis komposisi minyak jeruk purut dengan GC-MS. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode sumuran dengan konsentrasi larutan 100, 300, 500 $\mu\text{L/mL}$ dalam pelarut etanol, sedangkan konsentrasi hambat minimum (KHM) ditentukan menggunakan metode *microdilution*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa makin besar konsentrasi larutan minyak jeruk purut makin tinggi daya hambatnya dengan minyak jeruk purut dari kulit buah lebih kuat dibandingkan minyak jeruk purut dari daun dan ranting. Nilai KHM terhadap bakteri *E. coli* sebesar 25,0; 50,0 dan 12,5 $\mu\text{L/mL}$ dan terhadap bakteri *B.cereus* sebesar 6,25; 12,5 dan 3,12 $\mu\text{L/mL}$ berturut-turut untuk minyak jeruk purut dari daun, ranting dan kulit buah. Sitronelal sebagai komponen utama minyak jeruk purut dari daun dan ranting dengan kadar 85,07 % dan 46,40%, sedangkan komponen utama minyak jeruk purut dari kulit buah meliputi sabinen (9,21%), β -pinen (21,44%), limonen (12,59%), sitronelal (20,91%) dan terpinen-4-ol (11,93%).

Kata Kunci: minyak jeruk purut, *E. coli*, *B.cereus*.

ABSTRACT

Activity tests of essential lime oil (*Citrus hystrix* DC) from its leaves, twigs, and rinds on the growth of gram-negative bacteria *E. coli* and gram-positive *B. cereus* have been conducted. Essential lime oil was obtained by steam distillation of leaves, twigs and rind for 5 h. GC-MS was used to analyze the composition of essential lime oil. Well diffusion method was used for antibacterial activities testing with concentrations of solution were 100, 300, 500 $\mu\text{L/mL}$ in ethanol and microdilution method was used to determine the minimal inhibitory concentrations (MICs). The results showed that higher concentration of essential lime oil led higher minimal inhibitory in which minimal inhibitory of essential oil from rind was higher than that of leaves and twigs. MICs values of *E.coli* are 25, 50 and 12.5 $\mu\text{L/mL}$ and of *B.cereus* are 6.25, 12.5 and 3.12 $\mu\text{L/mL}$ of leaves, twigs and rind, respectively. Citronellal compound was found as main component of essential lime oil from leaves and twigs with value of 85.7 % and 46.4 %, respectively. In addition,

sabinene (9.2%), β -pinene (21.4%), limonene (12.5%), citronellal (20.9%) and terpinene-4-ol (11.9%) were found as compounds of essential lime oil from rind.

Keywords: essential lime oil, *E. coli*, *B.cereus*

PENDAHULUAN

Minyak atsiri merupakan metabolit sekunder hasil proses metabolisme yang kompleks, terutama melalui jalur mevalonat yang menghasilkan molekul bersifat volatil monoterpen hidrokarbon dan monoterpen ter-oksigenasi serta sesquiterpen atau jalur sikimat yang menghasilkan senyawa fenol [1]. Produksi minyak atsiri terjadi di bagian glandular trikoma, struktur sekresi lainnya dan jaringan sekresi khusus yang mendifusikan ke permukaan organ tanaman [2]. Hampir semua organ tanaman memiliki aroma, seperti bunga, tunas, batang, daun, buah, biji, dan akar mengandung minyak atsiri [1,3].

Senyawa metabolit sekunder bagi tanaman berfungsi untuk melindungi tanaman dari mikroorganisme patogen, mengusir serangga yang merupakan vektor wabah dan memberikan rasa tidak enak pada tanaman sehingga mengurangi nafsu makan beberapa herbivora [4].

Selama ini minyak atsiri telah digunakan sejak zaman kuno, dalam banyak sistem pengobatan tradisional yang berbeda di seluruh dunia, karena aktivitas biologisnya [2]. Bahkan Minyak atsiri jeruk purut telah digunakan sebagai agen pemberi rasa dan aroma, serta pembuatan wewangian dan obat [5].

Beberapa penelitian praklinis telah melaporkan aktivitas minyak atsiri antara lain sebagai antimikroba, antioksidan, anti-

inflamasi dan antikanker [2,4] dalam sejumlah sel dan hewan model, termasuk mengelusidasi mekanisme aksi dan target farmakologisnya, meskipun studi pada manusia masih minim yang membatasi potensi minyak atsiri sebagai sumber fitoterapeutik yang efektif dan aman [2].

Minyak jeruk purut merupakan salah satu jenis minyak atsiri yang asli Indonesia dan mulai dikembangkan yang produksinya mencapai 2-3 ton per tahun [6] dengan harga jual sebesar 65,00-75,00 USD per kilogram.

Bioaktivitas minyak jeruk purut dilaporkan cukup luas, antara lain efektif terhadap 20 tipe *Salmonella* dan 5 jenis enterobacteria [7], termasuk aktif sebagai antibakteri, antijamur, antioksidan, antiviral, antiparasit dan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia [8]. Menurut Chueahongthong, *et al* [8], ekstrak kasar daun jeruk purut dengan pelarut organik, meliputi n-heksana, etanol, etilasetat, butanol dan metanol seluruhnya mampu memberikan aktivitas sitotoksik pada sel-sel leukemia dengan aktivitas sitotoksik, IC₅₀ > 100 μ g/mL.

Wungsintaweekul, *et al* [9], melaporkan bahwa minyak jeruk purut dari kulit dan daun memiliki pola komposisi kimia yang sama dengan sitronelal sebagai komponen utama (\pm 23%), sedangkan komponen lainnya meliputi linalool (4,22%), β -pinene (1,82%) dan limonene (1,13%). Tetapi menurut Othman, *et al.*[10], sabinen sebagai

komponen utama dalam kulit buah jeruk purut (36,4%-48,5%), sedangkan minyak jeruk purut dari daun didominasi sitronelal (61,7%-72,5).

Berdasarkan uraian di atas, menarik untuk dikaji sejauh mana minyak jeruk purut (daun, ranting dan kulit buah) dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Jenis bakteri gram negatif, seperti *E. coli* [11] dan gram positif, seperti *B. cereus* [12], keduanya bersifat patogen yang menyebabkan keracunan pangan dan seringkali menimbulkan wabah penyakit karena penyebarannya sangat cepat.

METODE PENELITIAN

1. Penyulingan Minyak Jeruk Purut.

Digunakan sampel daun, ranting dan kulit buah jeruk purut dari Kesamben, Blitar, Jatim. Semua sampel dalam keadaan segar dan dilakukan penyulingan air-uap sebanyak 1,4–3,2 kg, selama 5-6 jam. Minyak yang diperoleh dikeringkan dengan $MgSO_4$.

2. Analisis Komposisi Minyak Jeruk Purut dengan GC-MS

Setiap sampel dianalisis dengan GC-MS menggunakan tipe Shimadzu (QP 2010S) dengan sistem bombardir elektron tegangan : 70 eV, suhu injektor 300 °C, suhu detektor 320 °C, tekanan 12 Pa. Kolom kapiler DB-1 (L 30 m, ID 0,25 mm), suhu 50–260 °C (5 °C/menit). Gas pembawa He, kecepatan alir 3 mL/menit. Kromatogram yang dihasilkan di-scanning untuk memperoleh data spektra massa. Database pada library digunakan sebagai pembanding otomatis untuk membantu analisis struktur kimia.

3. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Jeruk Purut

a. Pembuatan Media Agar (NA)

Dibuat larutan media nutrisi agar (NA) dalam air panas (20 g/L), kemudian di autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 15 menit. Pada kondisi hangat selanjutnya media dituangkan ke petri dish sebanyak 15 ml, dan didiamkan sampai media menjadi memadat pada suhu ruang.

b. Peremajaan dan Inokulasi Bakteri

Bakteri uji diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya. Inokulasi bakteri dilakukan dengan mengambil 1 ose kultur bakteri dengan jarum ose dari stok kultur, kemudian dipindahkan ke media agar miring NA steril dengan cara di goreskan zig-zag pada permukaan. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 hari (24 jam).

c. Pembuatan Suspensi Bakteri

Menyiapkan media cair steril nutrisi broad (NB) dalam tabung reaksi dan mengambil 1 ose kultur dari agar miring, kemudian dicelupkan kepada media cair. Di vortex untuk melarutkan suspensi bakteri secara sempurna. Suspensi bakteri dibuat jumlah koloni 10^7 CFU/mL.

d. Pengujian Antibakteri dengan Metode Sumuran

Media agar dituangkan pada cawan petri secara aseptis, dan ditunggu hingga memadat. Penginokulasian suspensi bakteri sebanyak 0,1 mL pada permukaan media agar dengan menggunakan *mikropipet* dan di spread menggunakan kaca *spreader*. Kemudian media agar dibuat sumuran dengan menggunakan *cok bore* dan diisi dengan larutan minyak jeruk purut (dalam

pelarut etanol) sebanyak 50 μL dari masing-masing larutan (100; 300; 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Pengamatan dan pengukuran zona bening dilakukan selang 24 jam (hari ke dua).

e. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum, KHM dengan Metode Kontak (*Microdilution*)

Disiapkan larutan minyak jeruk purut (dalam pelarut etanol) konsentrasi 3,12 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 1,56 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 6,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, yang dibuat dengan mengencerkan larutan 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ dengan 1 mL media NB. Masing-masing di inokulasi secara aseptis dengan 1 mL suspensi bakteri (10^7 CFU/mL). Kemudian campuran media uji di vortek sampai homogen dan di inkubasi dengan *inkubator shaker* (kecepatan 120 rpm), pada suhu ruang selama 18-24 jam. Setelah di inkubasi, sampel uji di angkat dan diambil 10 μL dan ditanam pada 10 mL media NA cair. Selanjutnya media NA cair yang mengandung sampel uji digoyang sampai membentuk angka delapan yang diikuti dengan mendinginkan media pada suhu ruang hingga memadat. Setelah memadat, media di inkubasi selama 18-24 jam dan dilakukan perhitungan jumlah bakteri dari setiap konsentrasi. Dapat dikatakan sebagai bakterisidal apabila ekstrak minyak atsiri jeruk purut dapat membunuh bakteri 90% dan apabila sebaliknya maka minyak atsiri jeruk purut dikatakan bersifat bakteristatis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Minyak jeruk purut hasil penyulingan air-uap, beraroma khas, warna kuning jernih dan berat jenis 0,86 g/mL Rendemen masing-masing minyak jeruk purut hasil sulingan sampel segar selama 5-6 jam cukup tinggi 0,66-0,68% (Tabel 1), sedangkan komponen utama hasil analisis dengan GC-MS (kadar $\geq 2\%$). disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 1. Rendemen hasil penyulingan minyak jeruk purut

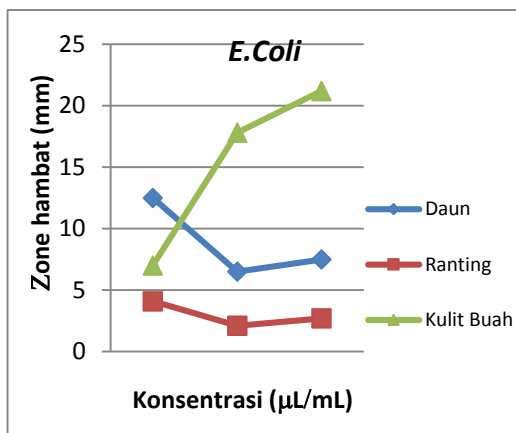
Jenis sampel	Massa sampel (kg)			Rendemen (%)
	Volume minyak atsiri (mL)			
	1	2	3	
Daun	1,5 (12)	1,4 (11)	1,4 (11)	0,68
Ranting	1,3 (10)	1,4 (10,5)	1,4 (11)	0,67
Kulit buah	2,5 (21)	2,5 (20,5)	2,7 (23,5)	0,66

Tabel 2. Komposisi kimia minyak jeruk purut

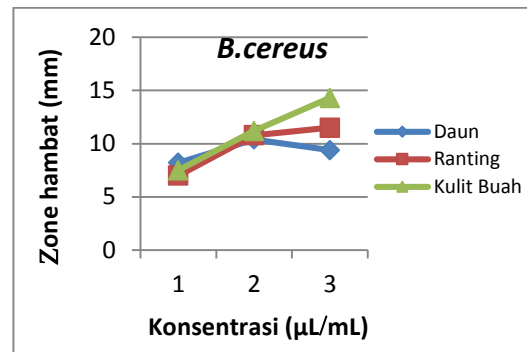
Jenis senyawa	Kadar (%)		
	Minyak jeruk daun	Minyak jeruk ranting	Minyak jeruk kulit buah
Sabinen	2,79	5,91	9,21
β -pinen	-	-	21,44
Limonen	-	-	12,59
γ -Terpinen	-	-	2,29
Linalil epoksida	-	-	4,23
Linalool	3,46	13,11	-
Sitronelal	85,07	46,40	20,91
Sitronelol	-	11,03	-
Sitronelil asetat	2,77	6,76	-
Terpinen-4-ol	-	-	11,93
α -Terpeniol	-	-	5,16

Komposisi kimia minyak jeruk purut daun dan ranting memiliki pola sama, yang didominasi oleh komponen monoterpen teroksigenasi, yaitu sitronelal sebagai komponen paling dominan dengan kadar mencapai 85,07% dan 46,40% serta komponen lain, seperti linalool dan sitronelil asetat. Minyak jeruk purut dari kulit buah komposisi kimia lebih bervariasi dengan komponen monoterpen hidrokarbon yang relatif sama dengan komponen monoterpen teroksigenasi. Komponen monoterpen hidrokarbon meliputi sabinen, β -pinen, limonen, γ -terpinen, sedangkan komponen monoterpen teroksigenasi antara lain linalil epoksida, sitronelal, terpinen-4-ol dan terpeniol.

Aktivitas minyak jeruk purut terhadap bakteri *E.coli* dan *B.cereus* disajikan dalam Gambar 1 dan 2. Tampak bahwa daya hambat minyak jeruk purut dari kulit buah terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *B.cereus* lebih kuat dibanding daya hambat minyak jeruk purut dari daun maupun dari ranting. Disamping itu dijumpai pula bahwa makin tinggi konsentrasi minyak jeruk purut dari kulit buah, makin tinggi daya hambatnya.

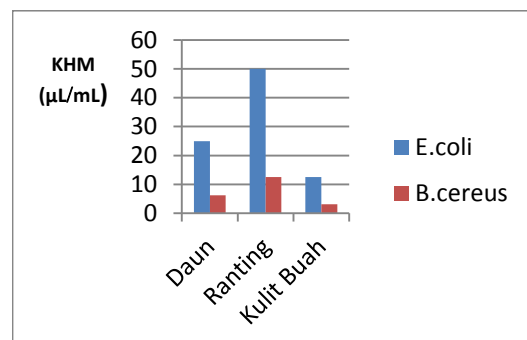


Gambar 1. Zone hambat minyak jeruk purut terhadap bakteri *E.coli*.



Gambar 2. Zone hambat minyak jeruk purut terhadap bakteri *B.cereus*.

Hasil yang sama ditunjukkan dari uji secara *microdilution*, yaitu nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) minyak jeruk purut dari kulit buah memiliki nilai paling kecil dibanding nilai KHM minyak jeruk dari daun dan ranting, baik terhadap bakteri *E. coli* dan *B.cereus*, berturut-turut 12,5 $\mu\text{L/mL}$ dan 3,12 $\mu\text{L/mL}$ (Gambar 3).



Gambar 3. Nilai KHM minyak jeruk purut terhadap bakteri *E.coli* dan *B.cereus*

Fakta di atas dapat dikaitkan dengan komposisi minyak jeruk purut dari kulit buah yang memiliki kandungan komponen monoterpen hidrokarbon yang lebih tinggi, yaitu sabinen, β -pinen, limonen dan γ -terpinen berturut-turut dengan kadar 9,21%, 21,44%, 12,59% dan 2,29%. Komponen monoterpen hidrokarbon ini diduga lebih mudah berdifusi menembus membran sel untuk mencapai molekul target.

Fakta ini juga didukung oleh beberapa peneliti sebelumnya, yang menyatakan bahwa limonen merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri kuat [13], termasuk terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *E.coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* [14]. Disamping itu kemampuan minyak jeruk purut untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *B.cereus* yang kuat dibanding terhadap *E.coli* diduga berkaitan dengan kondisi sel bakteri gram positif berlapis tunggal yang relatif lebih sederhana, sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja.

KESIMPULAN

Minyak jeruk purut dari kulit buah memiliki daya hambat yang lebih kuat terhadap bakteri *E.coli* dan *B.cereus* dibanding minyak jeruk purut dari daun dan ranting. Makin tinggi konsentrasi larutan minyak jeruk purut ini, makin tinggi daya hambatnya.

Komposisi minyak jeruk purut dari daun dan ranting didominasi oleh komponen monoterpen hidrokarbon teroksigenasi dengan kadar sitronelal sebesar 85,07% dan 46,40%, sedangkan minyak jeruk purut dari kulit buah memiliki komponen monoterpen hidrokarbon, yaitu sabinen, β -pinen, limonen dan γ -terpinen berturut-turut dengan kadar 9,21%, 21,44%, 12,59% dan 2,29% yang relatif seimbang dengan komponen mono-terpen hidrokarbon teroksigenasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dirjen Pendidikan Tinggi Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui skim PU-PT dengan kontrak No : 007/Add/SP2H/PL/DIT.LIT.LITABMAS/V/2015.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Dhifi, W. et al., "Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical (Review)", *Medicines*, 3 (25), 1-16, doi:10.3390, 2016.
- [2] Sharifi-Rad, J. et al., "Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemecology to Traditional Healing Systems (Review)", *Molecules* 22 (70), 1-55, doi:10.3390, 2017.
- [3] Pandey, A.K. et al., "Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview". *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4 (9): 682-694, 2014.
- [4] São Pedro, A. et al., "The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity, *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them*" (Méndez-Vilas, A., ed.) *Formatex Research Center Publisher*, 2, 1364-1374, 2013.
- [5] Doreen, S.H et al., Preliminary evaluation on the antibacterial activities of *Citrus hystrix* oil emulsions stabilized by tween 80 and span 80, *Int J. Pharm Pharm Sci.*, 3 (Suppl 2), 209–2011, 2011.
- [6] Rusli, M.S., "Effort and challenges for sustainable essential oil production in Indonesia", *Conference Proceeding the IFEAT International Conference in Singapore*, 161-169, 2012.

- [7] Sköld M. et al., "The fragrance chemical β -caryophyllene-air oxidation and skin sensitization". *Food and Chemical Toxicol.*, 44: 538–545, 2006.
- [8] Chueahongthong, F. et al., "Cytotoxic effects of crude kaffir lime (*Citrus hystrix*, DC.) leaf fractional extracts on leukemic cell lines", *J.Medic.Plants Res*, 5 (14), 3097-3105, 2011.
- [9] Wungsintaweekul, J. et al., "Anti-microbial, antioxidant activities and chemical composition of selected Thai spices". *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 590 32 (6), 589-598. 2010.
- [10] Othman, S.N.A. et al., "Essential Oils from the Malaysian Citrus (*Rutaceae*) Medicinal Plants (Review)", *Medicines*, 3, 13;1-11, doi:10.3390/me, 2016.
- [11] Premarathne J. M. K. J. K. et al., "Risk of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to the consumption of beef". *Food Research* 1 (3) : 67–76, 2017.
- [12] Tausch, F. et al., "Evidence for Complex Formation of the *Bacillus cereus* Haemolysin BL Components in Solution", *Toxins* 2017, 9, 288; doi:10.3390/toxins9090288, 2017.
- [13] Cosentino, S. B. et al., "Composition and Antimicrobial Properties of Sardinian Juniperus Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms". *J Food Prot*, 66,1288-1291, 2003.
- [14] Borgou, S. et al., "Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation". *The Sci. World J.*, 10:1100-1110, 2012.