

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI *EUCALYPTUS PELLITA* TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Dina Putri Astiani*, Afghani Jayuska, Savante Arreneuz

Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,

Jln. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi 78124, Pontianak

*Email: astiani08@yahoo.co.id

ABSTRAK

Daun Eucalyptus pellita merupakan limbah industri yang mempunyai potensi sebagai minyak atsiri. Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam minyak atsiri dari Eucalyptus diketahui dapat berperan sebagai antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan senyawa kimia minyak atsiri E. pellita dan aktivitas antibakterinya terhadap bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus serta nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC) minyak atsiri tersebut. Minyak atsiri E. pellita diperoleh dengan menggunakan metode destilasi uap. Rendemen minyak yang dihasilkan 89% b/b dan diperoleh 33 senyawa yang terdeteksi menggunakan Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). Terdapat enam senyawa utama dengan komposisi diatas 5% yaitu β -pinen (20,88%), trans-kariopilen (15,60%), α -pinen (10,41%), globulol (7,64%), bornilen (6,74%) dan spatulenol (6,08%). Aktivitas antibakteri minyak atsiri terhadap bakteri E. coli dan S. aureus mempunyai zona bening masing-masing sebesar 13,1 dan 17,4 mm dan mempunyai daya hambat pertumbuhan bakteri yang sedang. Nilai MIC minyak atsiri terhadap bakteri E. coli dan S. aureus masing-masing sebesar 1,22 dan 1,19 yang memiliki aktivitas yang sedang.

Kata kunci : minyak atsiri, senyawa kimia, antibakteri, nilai MIC, E. pellita

PENDAHULUAN

Tanaman *E. pellita* termasuk famili Myrtaceae yang ditemukan di hutan terbuka bersamaan dengan sejumlah besar spesies *Eucalyptus* lainnya, di hutan sklerofil dan dipinggiran hutan hujan. *E. pellita* berasal dari Australia dan Papua New Guinea, tetapi dapat tumbuh dengan baik di daerah tropis seperti Brazil, Kongo, Fiji, India, Indonesia, Kenya, Afrika Selatan dan Uruguay. *E. pellita* dapat tumbuh pada ketinggian 0-800 m, suhu 4-19°C hingga 24-34°C dan curah hujan 900-4000 mm (Orwa et al, 2009). Minyak atsiri *Eucalyptus* merupakan minyak yang dihasilkan dari proses penyulingan tanaman *Eucalyptus* sp. yaitu dari bunga, daun dan kulit batang (Damanik, 2009). Minyak atsiri dari berbagai spesies *Eucalyptus* dilaporkan bersifat sebagai antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Bakteri *E. coli* dan *S. aureus* merupakan bakteri patogen yang sering menyerang manusia. Bakteri *E. coli* biasa menyerang pencernaan manusia dan dapat menyebabkan terjadinya diare. Sedangkan, bakteri *S. aureus* biasanya menyerang kulit manusia dan menyebabkan gatal-gatal pada kulit (Todar, 2004).

Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti terhadap spesies *Eucalyptus* seperti Santoso, et al, 2002 terhadap *E. globulus* Labillardiere dari Indonesia diketahui lima

komponen utama yang dianalisis dengan GC-MS yaitu 1,8-cineol (11,49%), terpin asetat (6,84%), karyophyllen oksida (5,73%), α -pinen (4,48%) dan spathulenol (4,15%).

Ghalem dan Mohamed (2008) melaporkan bahwa minyak atsiri *E. globulus* mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* dengan diameter zona bening masing-masing sebesar 24 mm dan 40 mm. Daya hambat pertumbuhan bakteri yang dimiliki minyak atsiri *E. globulus* terhadap bakteri *E. coli* sangat kuat sedangkan pada bakteri *S. aureus* daya hambatnya tergolong sedang.

Daun *E. pellita* pada kawasan Hutan Tanaman Industri PT. Finnantara Intiga merupakan limbah industri yang memiliki potensi sebagai minyak atsiri yang dapat berperan sebagai antibakteri yang hingga saat ini belum dimanfaatkan. Berdasarkan penelusuran pustaka di Indonesia belum pernah dilaporkan mengenai kandungan senyawa kimia minyak atsiri *E. pellita*, aktivitasnya sebagai antibakteri dan nilai MIC nya. Sehingga penelitian ini sangat penting untuk dilakukan.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat penyulingan autoklaf, bunsen, GC-MS Shimadzu QP 2010, hot plate, jangka sorong, laminar Air Tech, mikropipet

Acura 825, neraca analitik Avebture dan seperangkat alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah agar-agar, ekstrak ragi, natrium klorida, natrium sulfat anhidrat, pepton dan kloramfenikol.

Prosedur Penelitian

Sampling dan preparasi sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *E. pellita* yang diambil dari Hutan Tanaman Industri (HTI) PT. Finnantara Intiga Distrik Mengkiang Kabupaten Sanggau, Kalimantan Barat. Sampel daun *E. pellita* diambil di kampung Tabau Distrik Mengkiang pada pukul 09.00 WIB. Sampel daun *E. pellita* dibersihkan dan dikeringanginkan dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari langsung.

Destilasi minyak atsiri

Destilasi minyak *E. pellita* dilakukan dengan metode destilasi uap (Sartorelli, *et al*, 2007). Daun *E. pellita* yang telah dipotong-potong sebanyak 2 kg dan air dimasukkan ke dalam ketel penyulingan secara terpisah. Kemudian didestilasi selama 4 jam dengan suhu berkisar 100-105°C. Uap air dialirkan pada ketel penyulingan yang berisi daun *E. pellita*. Destilat yang dihasilkan ditampung ke dalam ketel penampungan. Destilat ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk menyerap air yang terdapat dalam destilat. Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam minyak *E. pellita* dianalisis menggunakan metode GC-MS. Rendemen minyak atsiri dicari dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{massa minyak (gr)}}{\text{massa sampel (gr)}} \times 100\%$$

Peremajaan Bakteri Uji

Media yang digunakan yaitu media *Nutrient Agar* (NA) dengan komposisi pepton 5 g, ekstrak ragi 3 g, NaCl 5 g, agar-agar 20 g. Media dilarutkan dalam 1 liter aquades dan dipanaskan hingga larut sempurna. Media disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Setelah steril, media NA dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan terpolimerisasi. Dari stok bakteri uji masing-masing diinokulasikan ke dalam media peremajaan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri minyak atsiri *E. pellita* ditentukan dengan menggunakan metode difusi

agar dengan pengulangan sebanyak dua kali. Kultur bakteri yang digunakan diremajakan dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri yang telah disegarkan kemudian disebarkan ke dalam media NA padat. Setelah itu, dibuat sumur (lubang) dengan menggunakan alat pembuat sumur. Sebanyak 50 µl minyak atsiri *E. pellita* dimasukkan ke dalam sumur, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pada penelitian ini digunakan DMSO sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol sebagai kontrol positif (Prescott, *et al*, 2002).

Penentuan Nilai MIC

Penentuan nilai MIC bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari minyak atsiri yang dapat menunjukkan aktivitas antibakteri yang ditandai dengan terbentuknya zona bening. Nilai MIC ditentukan menggunakan metode Bloomfield, dengan memplotkan antara ln (ln konsentrasi minyak atsiri) pada sumbu X terhadap kuadrat diameter zona bening pada sumbu Y. Nilai x didapat dari persamaan $y = ax + b$ dan diketahui sebagai nilai Mt. Nilai MIC merupakan nilai Mt dikalikan 0,25. Metode yang digunakan untuk penentuan nilai MIC sama dengan penentuan aktivitas antibakteri minyak atsiri *E. pellita* yaitu dengan metode difusi agar. Kultur bakteri yang digunakan disegarkan terlebih dahulu ditumbuhkan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri yang telah disegarkan kemudian disebarkan ke dalam media NA padat. Setelah itu, dibuat sumur (lubang) dengan menggunakan alat pembuat sumur. Sebanyak 1, 2, 3, 4 dan 5 µl minyak atsiri *E. pellita* dimasukkan ke dalam sumur, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong.

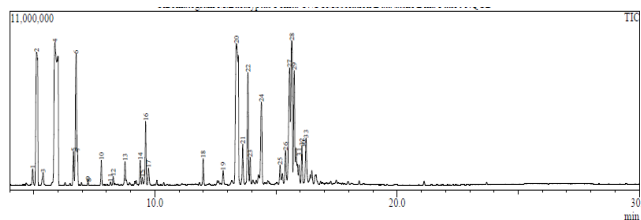
HASIL DAN PEMBAHASAN

Minyak Atsiri *Eucalyptus pellita*

Rendemen minyak *E. pellita* yang dihasilkan dari penelitian ini sebesar 0,89%(b/b) yang ditentukan dari nilai perbandingan antara berat minyak atsiri hasil penyulingan dengan berat sampel yang disuling. Rendemen yang diperoleh sedikit lebih tinggi dari yang dilaporkan Proenza, *et al*, (2013) dengan metode yang sama yaitu 0,89%(v/b) (setara dengan 0,80% (b/b)).

Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam minyak *E. pellita* dianalisis menggunakan

GC-MS. Hasil analisis GC-MS terdapat 33 puncak yang terdeteksi dari minyak *E. pellita*, ada satu senyawa yang persentase konsentrasinya kurang dari 0,1%. Kromatogram dari hasil analisis GC destilat minyak *E. pellita* dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram Minyak atsiri *E. pellita*

Pada gambar 1, senyawa dengan waktu retensi 5,117, 5,869, 6,748, 13,363, 15,559 dan 15,650 yang ditunjukkan dengan puncak yang tinggi merupakan kelimpahan relatif dari senyawa-senyawa yang kandungannya cukup besar dalam destilat. Kandungan minyak *E. pellita* terdiri dari golongan monoterpen dan seskuiterpen. Golongan monoterpen ($C_{10}H_{16}$) yaitu α -pinen, β -pinen dan bornilen, sedangkan yang termasuk golongan seskuiterpen ($C_{15}H_{24}$) yaitu trans-kariopilen, spatululenol dan globulol.

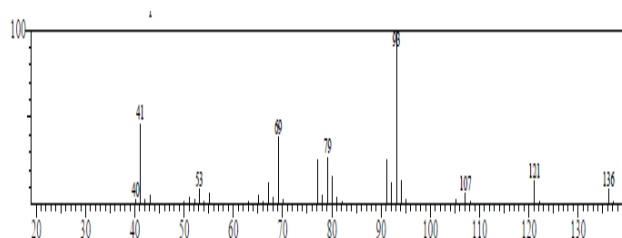
Berdasarkan tabel 1. diketahui ada enam senyawa utama dengan persentase konsentrasi >5,00% yaitu α -pinen (10,41%), β -pinen (20,88%), bornylen (6,74%), trans- β -karyophilen (15,60%), spatululenol (6,08%) dan globulol (7,67%). Hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap beberapa spesies *eucalyptus* dilaporkan bahwa senyawa utama dari minyak *eucalyptus* adalah 1,8-cineol. Senyawa utama yang didapat berbeda dengan yang dilaporkan Proenza *et al*, 2013 menyatakan bahwa terdapat empat senyawa utama yang terkandung dalam minyak *E. pellita* F. Muell di Cuba dengan persentase konsentrasi >5,00% yaitu α -pinen (27,19%), p-cimen (7,69%), limonen (23,84%) dan 1,8-cineol (19,01%). Sedangkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap minyak *E. pellita* 1,8-cineol ditemui sebagai senyawa minor (<1%) sebesar 0,72%. Sebelumnya Orwa *et al* (2009), melaporkan bahwa tidak terdapat kandungan 1,8-cineol pada minyak *E. pellita* F. Muell di Cuba, sedangkan yang dilaporkan Proenza *et al* (2013) untuk spesies dan tempat pengambilan yang sama memiliki kandungan 1,8-cineol. Hal ini kemungkinan terjadi karena adanya perbedaan tempat tumbuh, curah hujan serta nutrisi yang terkandung didalam tanah yang berpengaruh dalam metabolisme tanaman. Sehingga mempengaruhi juga komposisi senyawa yang terkandung di dalam minyak *E. pellita*.

Tabel 1. Komposisi Kandungan Senyawa Kimia Minyak Atsiri *E. pellita*

Senyawa	Rumus Kimia	t_R	Komposisi (%)
α -pinen	$C_{10}H_{16}$	5,117	10,41
β -pinen	$C_{10}H_{16}$	5,869	20,88
Bornilen	$C_{10}H_{16}$	6,748	6,74
1,8-cineol	$C_{10}H_{18}O$	6,808	0,72
γ -terpinen	$C_{10}H_{16}$	7,237	0,15
α -terpinolen	$C_{10}H_{16}$	7,788	0,86
Limonen	$C_{10}H_{16}O$	8,167	0,11
oksida			
Trans-kariopilen	$C_{15}H_{24}$	13,363	15,60
Spatulenol	$C_{15}H_{24}O$	15,559	6,08
globulol	$C_{15}H_{26}O$	15,650	7,67

Spektra massa pada gambar 3 merupakan spektra dari senyawa target dengan berat molekul (BM) 136 gr/mol. Senyawa target memiliki indeks kemiripan sebesar 97% dengan spektra massa dari senyawa β -pinen yang terdapat dalam data library WILEY7.LIB. β -pinen merupakan senyawa utama yang terdapat dalam minyak atsiri *E. pellita*.

Spektra massa pada gambar 2 menunjukkan bahwa penembakan inti dengan elektron menghasilkan ion molekul induk (M^+) dengan $m/z = 136$ dan tumbukan berikutnya akan menyebabkan terjadinya fragmentasi. Ion molekul dengan $m/z = 136$ mengalami fragmentasi dengan melepaskan C_3H_7 membentuk fragmen dengan $m/z = 93$, kemudian terfragmentasi kembali melepaskan CH_2 membentuk fragmen dengan $m/z = 79$. Ion molekul seterusnya terfragmentasi membentuk fragmen dengan $m/z = 41$.



Gambar 2. Spektra Massa β -pinen

Uji Aktivitas Antibakteri

Penentuan aktivitas minyak atsiri *E. pellita* ditentukan dengan metode difusi sumur agar. Hasil uji aktivitas antibakteri minyak atsiri *E. pellita* ditunjukkan pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa sifat bakteriostatik (daya hambat) minyak atsiri terhadap bakteri *S. aureus* lebih besar dibandingkan terhadap *E. coli*. Hal ini dikarenakan *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang penyusun dinding selnya lebih

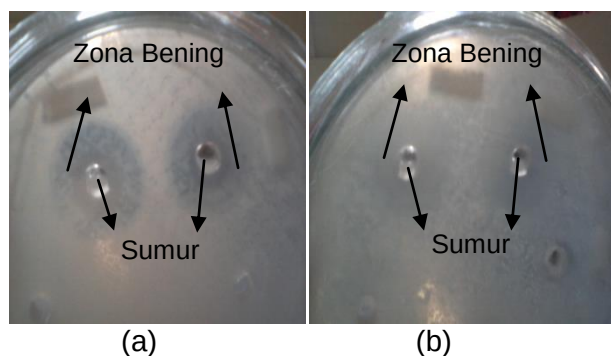
sederhana dibandingkan dengan *E. coli* yang merupakan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki kandungan lipid yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri gram positif (Jawetz *et al*, 2004). Biasanya bakteri gram negatif menghasilkan lendir untuk melindungi selnya dari senyawa yang merugikannya. Berdasarkan keefektifan kerjanya minyak atsiri *E. pellita* tergolong dalam antibakteri berspektrum luas karena dapat bekerja pada bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Zona bening pada bakteri uji *E. coli* dan *S.aureus* ditunjukkan pada gambar 3.

Tabel 2. Diameter Zona Bening

Bakteri Uji	Diameter Zona Bening (mm)	
	Minyak <i>E. pellita</i>	Kloramfenikol
<i>E. coli</i>	13,1	15,1
<i>S. aureus</i>	17,4	24,7

Berdasarkan data di atas, zona bening untuk bakteri *E. coli* dan *S. aureus* masing-masing sebesar 13,1 dan 17,4 mm. Menurut Ghalem dan Mohamed (2012) bahwa zona bening antar 10-25 mm memiliki kemampuan sedang (*intermediate*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Ini berarti minyak atsiri *E pellita* yang diperoleh mempunyai kemampuan sedang dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Proenza, *et al* (2013) melaporkan bahwa zona hambat yang dihasilkan oleh minyak atsiri *E. pellita* terhadap bakteri *E. coli* sebesar 11 mm dan pada bakteri *S. aureus* sebesar 23 mm.

Ghalem dan Mohamed (2012) melaporkan bahwa senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam minyak atsiri *E. globulus* seperti 1,8-cineol, sitronelal, sitronelol, sitronelil asetat, p-cimen, eukamalol, limonen, linalol, β -pinen, γ -terpinen dan α -terpineol merupakan senyawa kimia yang dapat berperan sebagai antibakteri. Senyawa-senyawa β -pinen, 1,8-cineol dan γ -terpinen yang terkandung dalam minyak atsiri *E. pellita* ini yang diprediksi berperan dalam penghambatan pertumbuhan bakteri uji.

Gambar 3. Zona bening pada bakteri (a) *E.coli* dan (b) *S. aureus*

Nilai MIC ialah nilai konsentrasi terendah senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Daya hambat minyak atsiri *E. pellita* ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai MIC Minyak Atsiri *E. pellita*

Bakteri Uji	Diameter Zona Bening (mm)					MIC (%) [*]
	1 μ l	2 μ l	3 μ l	4 μ l	5 μ l	
<i>E. coli</i>	0	4,9	7,2	6,8	7,8	1,22
<i>S.aureus</i>	0	5,5	6,7	7,2	7,6	1,19

*% (v/v)

Berdasarkan tabel 3 diketahui bahwa nilai MIC untuk bakteri *E. coli* dan *S. aureus* masing-masing sebesar 1,22 dan 1,19. Pada konsentrasi tersebut minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Menurut Matros *et al*, (2001) nilai MIC >0,1-2 memiliki aktivitas yang sedang, ini berarti minyak atsiri *E. pellita* memiliki aktivitas MIC yang sedang. Nilai MIC minyak atsiri *E. globulus* terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* masing-masing sebesar 0,09 (Vratnica, 2011). Sedangkan nilai MIC minyak atsiri *E. polycarpa*, *E. milliodora*, *E. largiflorence* dan *E. camaldulensis* terhadap bakteri *S.aureus* ATCC25923 masing-masing sebesar 1,95, 3,9, 7,8 dan 3,9 (Panahi, 2011).

Minyak atsiri *E. pellita* merupakan minyak dari golongan terpenoid, mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan, 1999).

SIMPULAN

Hasil yang dapat disimpulkan dari penelitian ini adalah:

1. Senyawa utama yang terdapat dalam minyak atsiri *E. pellita* yaitu α -pinen (10,41%), β -pinen (20,88%), bornylen (6,74%), trans-karyopilen (15,60%), spatulenol (6,08%) dan globulol (7,67%). Rendemen minyak atsiri yang diperoleh sebesar 0,89% (w/w).
2. Aktivitas antibakteri minyak atsiri *E. pellita* memberikan zona bening pada bakteri *E. coli* dan *S.aureus* masing-masing sebesar 17,4mm dan 13,1mm dan mempunyai daya hambat sedang.

3. Nilai MIC untuk bakteri *E.coli* dan *S. aureus* masing-masing sebesar 1,22 dan 1,19.

DAFTAR PUSTAKA

- Cowan, M.M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clin Microbiol Rev*, 12 (4), 564-582.
- Damanik, M., 2009, Kajian Minyak Atsiri Pada Ekaliptus (*Eucalyptus urophylla*) Umur 4 Tahun di PT Toba Pulp Lestari Tbk, Departemen Kehutanan Fakultas Pertanian, Universitas Sumatra Utara, (skripsi).
- Ghalem, B.R and Mohamed, B., 2008, Antibacterial Activity Of Leaf Essential Oils Of *Eucalyptus Globulus* and *Eucalyptus Camaldulensis*, *Afr. J. Pharm. Pharmacol*, 2 (10), 211-215.
- Ghalem, B.R and Mohamed, B., 2012, Antibacterial Activity Of The Essential Oils From The Leaves of *Eucalyptus Globulus* Against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*, *Asian Pac J Med*, 739-742.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg, 2004, Mikrobiologi Kedokteran, Edisi 23, Penerjemah: Hartanto, EGC Kedokteran, Jakarta.
- Matros, L., Wheeler, T and Sacramento., 2001, Microbiology Guide to Interpreting MIC (Minimum Inhibitory Concentration), *Microbiology Guide to Interpreting*, <http://the-vet.net> diakses pada 5 Desember 2013.
- Myllyniemi, A.L., 2004, Development of Microbiological Methods for the Detection and Identification of Antimicrobial Residues in Meat, Departement of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Helsinki, (disertasi).
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R and Simons, A., 2009, Agroforestry Database: a free reference and selection guide version 4.0, <http://www.agroforestry.org/af/treedb>, diakses pada 18 September 2012.
- Panahi, Y., Sattari, M., Babaie, A.P., Beiraghdar, F., Ranjbar, R., Joo, A.H and Bigdeli, M., 2011, The Essential Oils Activity of *Eucalyptus polycarpa*, *Eucalyptus largiflorence*, *Eucalyptus malliodora* and *Eucalyptus camaldulensis* on *Staphylococcus aureus*, *IJPR*, 10 (1), 43-48.
- Prescott, L.M., Harley, J.P and Klein, D.A., 2002, Microbiology, 5th Edition, Mc. Graw Hill, USA.
- Proenza, Y.G., Alvarez, R.Q., Tamayo, Y.V., Saavedra, M.A., Garcia, Y.S and Espinosa, R.H., 2013, Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Eucalyptus pellita* F. Muell, *J. Med. Plants Res*, 7 (27), 1979-1983.
- Sartorelli, P., Marquiere, A.D, Baroli, A.A, Lima, M.E.L and Moreno, P.R., 2007 Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Two Species of *Eucalyptus*, *Phytother. Res*, 21, 231-233.
- Todar, K., 2004, Todar's Online Textbook of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Madison.
- Vratnica, B.D., Dakov, T., Sukovic, D dan Damjanovic, J., 2011, Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus Globulus* Labill from Montenegro, *Czech J, Food Sci*, 29, (3), 277-284.