

**ISOLASI, IDENTIFIKASI KOMPONEN KIMIA DAN UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN LAMPES (*Ocimum sanctum* L.)
PADA *Staphylococcus auerus* DAN *Escherichia coli***



SKRIPSI

Ditulis dan diajukan untuk memenuhi sebagian
persyaratan mendapatkan gelar Sarjana Sains Kimia

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA**

2009

commit to user

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini di bimbing oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II

Soerya Dewi Marliyana, M.Si

NIP. 132 162 561

Ahmad Ainurrofiq, M.Si, Apt

NIP. 132 310 095

Dipertahankan didepan TIM Penguji Skripsi Pada :

Hari :

Tanggal :

Anggota TIM Penguji :

- 1.
- 2.

Disahkan Oleh :

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Sebelas Maret

Ketua Jurusan Kimia

Drs. Sentot Budi Rahardjo, Phd

NIP. 131 570 162

commit to user

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi saya yang berjudul “ISOLASI, IDENTIFIKASI KOMPONEN KIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN LAMPES (*Ocimum sanctum* L.) PADA *Staphylococcus auerus* DAN *Escherichia coli* adalah benar – benar hasil penelitian sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat kerja atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, September 2009

TITA WAHYU PRIHNAWATI

ABSTRAK

Tita wahyu prihnawati, 2009. ISOLASI, IDENTIFIKASI KOMPONEN KIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN LAMPES (*Ocimum sanctum* L.) PADA *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Skripsi. Jurusan kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret.

Telah dilakukan isolasi, identifikasi komponen kimia dan uji antibakteri minyak atsiri daun lampes (*Ocimum sanctum* L.) pada *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Minyak atsiri diperoleh dengan metode destilasi stahl dan identifikasi komponen kimia dengan analisis data GC-MS. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dilakukan dengan metode difusi.

Hasil isolasi minyak atsiri dengan destilasi stahl diperoleh kadar 0,41%. Identifikasi komponen kimia dengan analisis data GC-MS adalah α -pinen (2,55%), kamfen (0,73%), sabinen (0,12%), β -pinen (0,54%), endo-borneol (0,76%), α -kopaena (2,55%), β -elemen (11,55%), metil-eugenol (41,90%), trans-kariofilen (25,66%), α -humulen (1,24%), germakren-A (1,19%), germakren-D (9,95%) dan δ -kadinen (0,65%). Aktivitas antibakteri dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Nilai Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) untuk *Staphylococcus aureus* adalah 787,5 ppm dan *Eschericia coli* adalah 525,5 ppm.

Kata kunci : Minyak atsiri, *Ocimum sanctum* L., isolasi, aktivitas antibakteri, *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*

ABSTRACT

Tita wahyu prihnawati, 2009. ISOLATION, CHEMICAL COMPONENT IDENTIFICATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESENTIAL OIL OF (*Ocimum sanctum* L.) ON *Staphylococcus aureus* DAN *Eschericia coli*. Thesis. Departement of Chemistry. Mathematic and Natural Sciences Faculty Sebelas Maret University.

Isolation, chemical component identification and antibacterial activity of the essential oil of *Ocimum sanctum* L. on *Staphylococcus aureus* and *Eschericia coli* have been done. The essential oil obtained by stahl distillation of *Ocimum sanctum* L. was analized by GC-MS. Antibacterial activity of essential oil was recognized by disc diffusion methods.

The essential oil yield by stahl distillation is 0,41%. Compounds of essential oil identified by GC-MS are α -pinene (2,55%), camphene (0,73%), sabinene (0,12%), β -pinene (0,54%), endo-borneol (0,76%), α -copaena (2,55%), β -elemene (11,55%), methyl-eugenol (41,90%), trans-caryophyllene (25,66%), α -humulene (1,24%), germacrene-A (1,19%), germacrene-D (9,95%) dan δ -cadinene (0,65%). Antimicrobial activity of the essential oil was investigated against *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values for *Staphylococcus aureus* was determined at 787,5 ppm dan for *Eschericia coli* at 525,5 ppm.

Keyword : Essential oil, *Ocimum sanctum* L., isolation, antibacteri activity, *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*

MOTTO

Barang siapa yang menuntut ilmu karena Allah maka ia seperti orang yang berpuasa pada siang hari dan beribadah pada malam hari. Dan sesungguhnya satu bab ilmu yang dipelajari oleh seseorang itu lebih baik dari pada ia mempunyai emas sebesar bukit Abu Qubais lalu ia menginfakkan pada jalan Allah ta'ala.

(Sabda Rasullolah)

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, kerjakanlah dengan sungguh – sungguh urusan yang lain.

(Q.S. Al-Insyirah : 6-7)

Jadikanlah sabar dan shalat sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah beserta orang – orang yang sabar.

(Q.S. Al Baqarah : 153)

Tiap – tiap yang berjiwa pasti akan merasakan mati.

Kemudian hanyalah kepada Kami kamu dikembalikan.

Dan orang – orang yang beriman dan mengerjakan amal – amal saleh, sesungguhnya akan kami tempatkan mereka pada tempat – tempat yang tinggi di dalam surga, yang mengalir sungai – sungai dibawahnya, mereka kekal di dalamnya. Itulah pembalasan bagi orang – orang yang beramal.

(Q.S. Al Ankabut : 57-59)

commit to user

PERSEMBAHAN



Karya kecil ini kupersembahkan untuk :

Bapak dan Ibu tercinta, yang senantiasa mendoakan, mencurahkan segala kasih sayang, pengorbanan dan semuanya.

Kakak, atas semua nasehat, bantuan dan motivasi serta waktu yang diluangkan selama ini.

Teman – teman yang telah memberiku semangat, dukungan dan motivasi.

commit to user

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan karunianNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “ISOLASI, IDENTIFIKASI KOMPONEN KIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN LAMPES (*Ocimum sanctum* L.) PADA *Staphylococcus auerus* DAN *Escherichia coli*”. Shalawat dan salam senantiasa penulis haturkan kepada Rasulluloh SAW sebagai pembimbing seluruh umat manusia.

Dalam penyusunan skripsi ini banyak bantuan, bimbingan, arahan dan petunjuk yang diberikan kepada penulis sehingga dapat terselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Drs. Sutarno, M.Sc, PhD. selaku Dekan FMIPA UNS.
2. Bapak Prof. Drs. Sentot Budi Rahardjo, PhD. selaku Ketua Jurusan.
3. Bapak Drs. Mudjijono, PhD. selaku Pembimbing Akademik.
4. Ibu Soerya Dewi Marliyana, M.Si. selaku Sekretaris Jurusan Kimia dan Pembimbing I.
5. Bapak Ahmad Ainurrofiq, M.Si., Apt. selaku pembimbing II.
6. Bapak dan Ibu Dosen di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret atas semua ilmu yang berguna dalam penyusunan skripsi ini.
7. Para Laboran di Laboratorium Kimia FMIPA, Sub Laboratorium Biologi dan Sub Laboratorium Kimia Pusat MIPA UNS atas bantuan dan kerjasama dengan baik.

Akhir kata semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi penulis dan semua pihak yang membutuhkan.

Surakarta, September 2009

commit to user

TITA WAHYU PRIHNAWATI

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
MOTTO	vi
PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang masalah	1
B. Perumusan masalah	3
1. Identifikasi masalah	3
2. Batasan masalah	4
3. Rumusan masalah	5
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat penelitian	5
BAB II. LANDASAN TEORI	6
A. Tinjauan pustaka	6
1. Tanaman lampes (<i>Ocimum santum</i> L.)	6
2. Minyak atsiri	7
a. Biosintesis jalur asam mevalonat	7
b. Biosintesis jalur asam sikimat	11
3. Isolasi Minyak Atsiri	13
4. Kromatografi Gas-Spektrometer Massa	16

5. Bakteri	18
a. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
b. <i>Eschericia coli</i>	23
6. Antibakteri	24
7. Antibiotik.....	26
8. Media	28
9. Uji aktivitas antibakteri	29
B. Kerangka Pemikiran	31
C. Hipotesis	32
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	33
A. Metode Penelitian	33
B. Waktu dan tempat penelitian	33
C. Alat dan bahan	33
1. Alat	33
2. Bahan	34
D. Prosedur penelitian	34
1. Identifikasi dan determinasi awal	34
2. Persiapan sampel daun lampes	34
3. Isolasi minyak atsiri	34
4. Identifikasi komponen kimia minyak atsiri daun lampes	35
5. Uji antibakteri minyak atsiri	35
E. Teknik pengumpulan dan Analisis Data	37
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
A. Determinasi bahan awal	38
B. Persiapan sampel	38
C. Isolasi minyak atsiri	38
D. Identifikasi komponen kimia minyak atsiri daun lampes	39
E. Biosintesis senyawa minyak atsiri daun lampes	43
1. Biosintesis lima senyawa golongan monoterpen	43
2. Biosintesis tujuh senyawa golongan seskuiterpen	44
F. Uji antibakteri	47

1. Uji aktivitas antibakteri Minyak Atsiri Daun lampes	47
2. Penetapan KHM Minyak Atsiri Daun lampes	49
3. Penetapan KHM Ampisilin dan Nilai Banding	51
BAB V. PENUTUP	54
A. Kesimpulan	54
B. Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	58



DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Ciri – ciri bakteri gram positif dan gram negatif	19
Tabel 2. Data spektra massa 13 komponen minyak atsiri daun lampes.....	40
Tabel 3. Fragmentasi senyawa 1 dibandingkan dengan fragmentasi Senyawa α -kopaena (WILEY7.LIB) dengan SI = 97	42
Tabel 4. Fragmentasi senyawa 11 dibandingkan dengan fragmentasi senyawa trans-kariofilen (WILEY7. LIB) dengan SI = 95	43
Tabel 5. Data aktivitas minyak atsiri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	48
Tabel 6. Data aktivitas KHM minyak atsiri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	50
Tabel 7. Data aktivitas KHM ampisilin terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	51
Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri konsentrasi 1050 ppm terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	52

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Tanaman lampes	7
Gambar 2. Mekanisme biosintesis senyawa terpen melalui jalur asam mevalonat	8
Gambar 3. Mekanisme perubahan dari GPP menjadi mentil/ α -terpinil kation	10
Gambar 4. Mekanisme perubahan mentil/ α -terpinil kation menjadi turunannya	10
Gambar 5. Pengubahan farnesil kation menjadi turunannya	11
Gambar 6. Jalur biosintesis senyawa fenil propenoid	12
Gambar 7. Diagram GC-MS	17
Gambar 8. Penampang bakteri	18
Gambar 9. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Gambar 10. <i>Escherichia coli</i>	22
Gambar 11. Reaksi asilasi gugus amino serin dari enzim transpeptidase oleh turunan antibiotik β laktam	26
Gambar 12. Mekanisme reaksi asilasi gugus amino serin dari enzim transpeptidase	27
Gambar 13. Kromatogram minyak atsiri daun lampes	40
Gambar 14. (a). Spektra massa senyawa 1, (b). Spektra massa α -kopaena....	41
Gambar 15. (a). Spektra massa senyawa 11, (b). Spektra massa trans-kariofilen	42
Gambar 16. Biosintesis senyawa monoterpen	44
Gambar 17. Biosintesis senyawa seskuiterpen	45
Gambar 18. Biosintesis dari kariofilen	46
Gambar 19. Modifikasi dari senyawa germakren	47
Gambar 20. Jalur biosintesis senyawa metil eugenol	47
Gambar 21. Hubungan konsentrasi ampisilin Vs Rata – rata DDH	53

commit to user

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Hasil determinasi daun lampes	58
Lampiran 2. Isolasi minyak atsiri	59
Lampiran 3. Perhitungan kadar sampel	60
a). Perhitungan kadar minyak atsiri hasil destilasi.....	60
b). Perhitungan kadar minyak atsiri untuk uji antibakteri	60
c). Tabel konsentrasi sampel uji aktivitas antibakteri yang telah dihitung dari persen menjadi ppm	61
Lampiran 4. Hasil uji GC-MS	62
a). Kromatogram GC-MS	62
b). Kondisi alat GC-MS	63
c). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 1	64
d). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 2	65
e). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 3	66
f). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 4	67
g). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 5	68
h). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 6	69
i). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 7	70
j). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 8	71
k). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 9	72
l). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 10	73
m). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 11	74
n). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 12	75
o). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 13	76
p). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 14	77
q). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 15	78
r). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 16	79
s). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 17	80
t). Spektra massa pembanding pada puncak senyawa 18	81

Lampiran 5.	Prosedur uji antibakteri	82
	a). Sterilisasi alat	82
	b). Pembuatan media agar miring	82
	c). Biakan bakteri	82
	d). Uji antibakteri	83
Lampiran 6.	Data aktivitas sampel	87
	a). Data aktivitas minyak atsiri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	87
	b). Data aktivitas ampisilin terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	89
	c). Data aktivitas antibakteri minyak atsiri (1050 ppm) terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	89
Lampiran 7.	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri minyak atsiri daun lampes ...	87
Lampiran 8.	Analisa One Way ANOVA pengaruh variasi bakteri pada masing-masing konsentrasi	88
Lampiran 9.	Analisa One Way ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada masing-masing bakteri	91
Lampiran 10.	Hasil uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) aktivitas Antibakteri minyak atsiri daun lampes	93
Lampiran 11.	Analisa One Way ANOVA pengaruh variasi bakteri pada masing – masing konsentrasi	94
Lampiran 12.	Analisa One Way ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada masing-masing bakteri	95
Lampiran 13.	Hasil uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) ampisilin terhadap bakteri	97
Lampiran 14.	Analisa One Way ANOVA pengaruh variasi Bakteri pada masing –masing konsentrasi	99
Lampiran 15.	Analisa One Way ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada masing – masing bakteri	108

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Indonesia adalah salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang terdapat di dalam hutan tropika Indonesia. Munculnya fenomena *back to nature* mengisyaratkan bahwa tanaman obat semakin penting peranannya dalam pola konsumsi makanan, minuman dan obat – obatan. Kekayaan hutan tropika Indonesia merupakan sumber produksi dan sumber tumbuhan berkhasiat obat yang potensinya perlu digali secara sungguh – sungguh untuk kepentingan kesejahteraan masyarakat.

Tumbuhan yang kurang dipergunakan oleh masyarakat Indonesia tetapi mempunyai potensi sebagai tanaman obat adalah tumbuhan lampes (*Ocimum sanctum* L.). Tumbuhan lampes dipergunakan sebagai obat penyakit diare, rematik, sariawan, gangguan ginjal, koreng, jerawat, antipiretik, ekspektoran, diuretik, diaforetik, laksan, emenagoga, karminatik). Pengetahuan kandungan kimia metabolit sekunder tumbuhan lampes (*Ocimum sanctum* L.) masih sedikit sekali diantaranya adalah flavonoid, saponin, alkaloid, tanin dan minyak atsiri (Soedibyo, 1998).

Minyak atsiri merupakan senyawa berwujud cairan, yang diperoleh dari bagian tanaman, akar, kulit, batang, daun, buah, biji maupun dari bunga dengan cara destilasi. Disamping itu juga, untuk memperoleh minyak atsiri dapat menggunakan cara lain seperti ekstraksi menggunakan pelarut organik atau dengan cara dipres (Sastrohamidjojo, 2004).

Minyak atsiri dapat berfungsi sebagai antibakteri karena minyak atsiri mempunyai kemampuan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri khususnya bakteri patogen pada manusia yang dapat menimbulkan penyakit. Penyakit yang biasanya ditimbulkan oleh bakteri adalah keracunan makanan. Beberapa jenis bakteri yang banyak menimbulkan keracunan makanan antara lain : *Salmonella sp*, *Listeria monocytopes*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

Staphylococcus aureus dan *Escherichia coli* merupakan bakteri patogen pada manusia. Kemampuan patogen menyebabkan penyakit tergantung kemampuan menyerang inang, berkembang biak, merusak pertahanan inang dan banyaknya bakteri yang menginfeksi. Jika jumlah patogen yang masuk sedikit, maka pertahanan tubuh dapat mengurangi patogen sebelum menyebabkan sakit sedangkan jika infeksi patogen lebih besar maka patogen dapat memberikan perlawanan pada pertahanan tubuh dan menyebabkan sakit (Black, 1999). Pemilihan bakteri *Staphylococcus aureus* karena bakteri tersebut merupakan bakteri yang patogen pada kulit, daerah saluran pernapasan bagian atas dan bisa menyebabkan penyakit infeksi seperti sariawan, koreng, jerawat serta ekspektoran dan *Escherichia coli* karena merupakan bakteri patogen pada usus dan bisa menyebabkan diare (Anonim, 1994).

Penyakit infeksi karena *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* umumnya diobati dengan antibiotik (Majid, 2005). Namun, sejalan dengan perkembangan dan penggunaannya tersebut menyebabkan bakteri patogen menjadi resisten terhadap antibiotik (Naim, 2003). Resistensi *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* terhadap antibiotik yang tersedia menjadi kurang efisien (Majid, 2005), sehingga akhir – akhir ini penggunaan dan pencarian obat dari sumber tanaman sebagai obat alternatif meningkat tajam (Cowan, 1999).

Beberapa penelitian uji aktivitas antibakteri minyak atsiri pada tumbuhan telah banyak dilakukan. Minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) mempunyai aktivitas antibakteri dengan nilai KHM 0,5% untuk *Staphylococcus aureus* dan 0,25% untuk *Escherichia coli* (Fauzia, 2007). Minyak atsiri daun salam (*Syzygium polyanthum* (wigh.) walp) mempunyai aktivitas antibakteri dengan nilai KHM 0,5% untuk *Staphylococcus aureus* dan 0,4% untuk *Escherichia coli* (Sudewi, 1992). Minyak atsiri rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) mempunyai aktivitas antibakteri dengan KHM pada konsentrasi 0,1 ppm untuk *Staphylococcus aureus* dan 1 ppm untuk *Escherichia coli* (Dewi, 2008).

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi, mengidentifikasi komponen senyawa kimia dan menguji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun lampes

terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil yang diperoleh dari penelitian tersebut diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemanfaatan tanaman berkhasiat obat pada umumnya dan pemanfaatan minyak atsiri tanaman lampes pada khususnya.

B. Perumusan masalah

1. Identifikasi Masalah

Bagian tanaman dan daerah pengambilan akan mempengaruhi kandungan minyak atsiri dari suatu tumbuhan, maka dalam pemilihannya haruslah spesifik. Tumbuhan lampes terdiri dari akar, batang, daun, bunga, buah dan biji yang masing – masing mempunyai kandungan yang berbeda. Tumbuhan lampes banyak tumbuh di Indonesia. Pada umumnya tumbuh di lahan pertanian yang tidak terlalu kering, di ladang dan di sawah.

Minyak atsiri merupakan senyawa yang mudah menguap, maka diperlukan suatu metode yang efektif dalam isolasinya. Isolasi minyak atsiri dari suatu bahan alam dapat dilakukan dengan cara ekstraksi dengan pelarut organik dan destilasi. Metode secara destilasi dapat dilakukan dengan menggunakan destilasi dengan air, destilasi dengan uap dan destilasi dengan uap dan air.

Minyak atsiri terdiri dari berbagai komponen kimia yang sebagian besar merupakan golongan monoterpen dan seskuiterpen, maka diperlukan suatu metode untuk mengidentifikasi komponen kimia tersebut. Identifikasi komponen kimia minyak atsiri dapat diidentifikasi dengan analisis data dari : Kromatografi Lapis Tipis (*Thin Layer Chromatography*), Kromatografi Gas–Spektrometer Massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), Spektrometer Infra Merah (*Infra Red Spectrometry*) dan Resonansi Magnet Inti (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*).

Minyak atsiri memiliki keaktifan biologis dalam kemampuan sebagai antibakteri, sehingga diperlukan suatu metode untuk mengetahui keaktifan biologis dari minyak atsiri tersebut. Uji aktifitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi, dilusi dan turbidimetri. Pada metode difusi zat akan ditentukan aktivitas antibakterinya berdifusi pada lempeng agar yang telah

ditanami bakteri yang diuji, dasar pengamatannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan di sekeliling cakram atau silinder yang berisi zat antibakteri. Pada metode dilusi zat antibakteri dicampur dengan media yang kemudian diinokulasi dengan bakterinya, dasar pengamatannya adalah tumbuh atau tidaknya bakteri. Pada metode turbidimetri pengamatan aktivitas antibakteri didasarkan atas kekeruhan yang terjadi didalam media pembenihan. Pertumbuhan bakteri ditentukan dari perubahan yang terjadi pada sebelum dan sesudah inkubasi yang diukur dengan mengukur serapannya dengan spektrofotometri.

Tanaman lampes mempunyai manfaat sebagai pencegah sariawan, koreng, jerawat, ekspektoran serta diare, maka diperlukan pemilihan suatu bakteri patogen yang khas sesuai dengan tempat hidupnya. Berdasarkan komposisi dan struktur dinding selnya, bakteri dibagi dalam 2 kelompok, yakni bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Beberapa bakteri gram positif misalnya *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, sedangkan bakteri gram negatif misalnya *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*.

2. Batasan Masalah

- a. Lampes didapat dari daerah Klaten dan bagian yang digunakan adalah daunnya.
- b. Isolasi dilakukan dengan destilasi stahl.
- c. Identifikasi komponen minyak atsiri pada tanaman lampes dilakukan dengan menggunakan analisis data GC-MS.
- d. Pengujian aktivitas antibakteri pada minyak atsiri dilakukan dengan metode difusi dengan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).
- e. Pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri dari daun lampes terhadap dua bakteri, yaitu *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif).

3. Rumusan Masalah

- a. Berapa kadar minyak atsiri daun lampes ?
- b. Bagaimana komponen senyawa kimia minyak atsiri daun lampes dengan analisis data GC-MS ?
- c. Bagaimana aktivitas antibakteri minyak atsiri daun lampes terhadap *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif) ?

C. Tujuan Penelitian

- a. Mengetahui kadar minyak atsiri daun lampes.
- b. Mengetahui komponen senyawa kimia minyak atsiri daun lampes dengan analisis data GC-MS.
- c. Mengetahui aktivitas antibakteri minyak atsiri daun lampes terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas minyak atsiri daun lampes (*Ocimum sanctum* L.) sebagai bahan antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

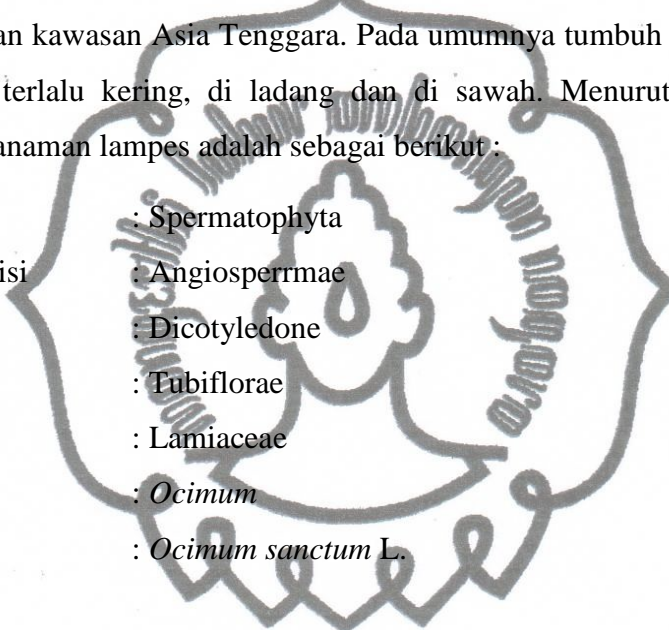
BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Lampes (*Ocimum sanctum* L.)

Tanaman lampes tumbuh di dataran rendah yang cukup mendapat sinar matahari, sampai ketinggian 600 m dpl, banyak tumbuh liar di Malaysia, Indonesia dan kawasan Asia Tenggara. Pada umumnya tumbuh di lahan pertanian yang tidak terlalu kering, di ladang dan di sawah. Menurut Anonim (1977), klasifikasi tanaman lampes adalah sebagai berikut :



Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Bangsa	: Tubiflorae
Suku	: Lamiaceae
Marga	: <i>Ocimum</i>
Jenis	: <i>Ocimum sanctum</i> L.

Tanaman lampes merupakan tanaman semusim yang mempunyai tinggi 30 – 150 cm terdiri dari batang, daun, bunga, buah, biji dan akar. Batang berbentuk segi empat, berkayu, beralur bercabang dan berbulu hijau. Daun berbentuk bulat telur, tunggal, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, pertulangan menyirip, panjang 14 – 16 mm, lebar 3 – 6 mm, panjang tangkai \pm 1 cm dan berwarna hijau. Bunga berbentuk tandan, elips, mahkota bulat telur, majemuk, berbulu dan berwarna putih keunguan. Buah berbentuk kotak dan berwarna coklat tua. Biji berbentuk kecil, tiap buah terdiri dari 4 biji dan berwarna hitam. Akarnya tunggang dan berwarna putih kotor (Anonim, 1991). Tanaman lampes ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman lampes

Tanaman lampes mengandung saponin, flavonoid, tanin, polifenol, dan minyak atsiri (Soedibyo, 1998). Tanaman lampes berguna sebagai antipiretik, ekspektoran, diuretik, diaforetik, laktagoga, emenagoga, karminatik, koreng, jerawat, mencegah diare, rematik, sariawan, gangguan ginjal dan pelembut kulit (Soedibyo, 1998).

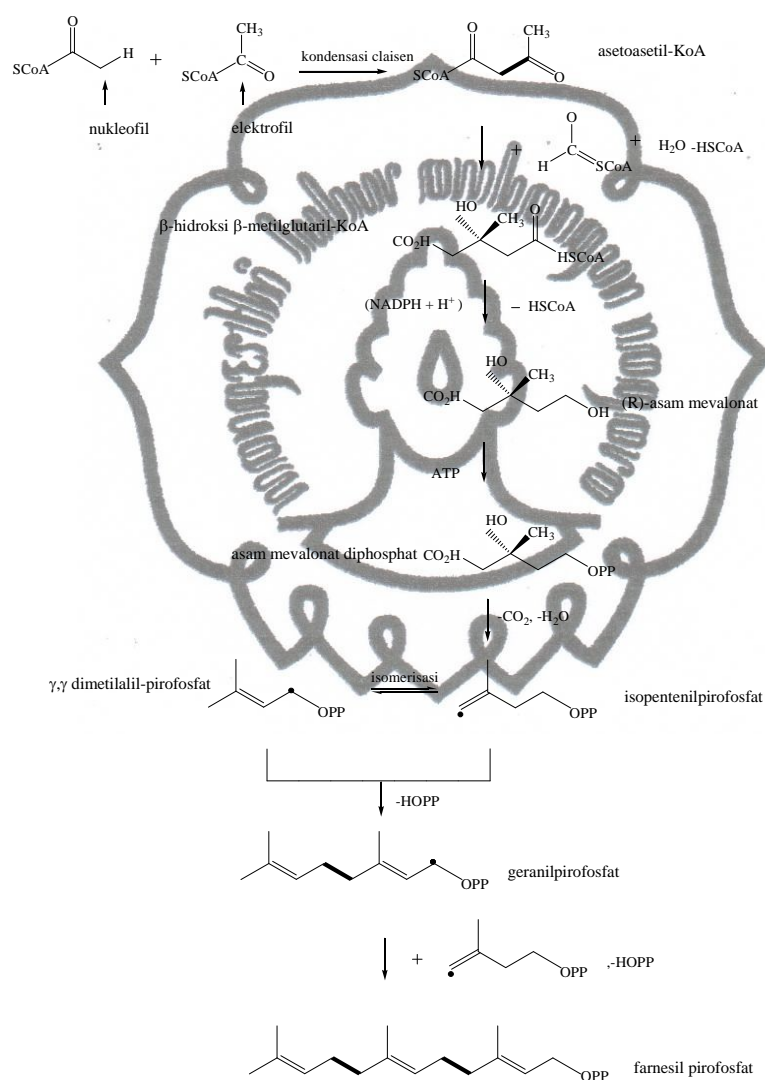
2. Minyak atsiri

Minyak atsiri atau minyak terbang merupakan senyawa volatil yang berasal dari bagian tertentu suatu tanaman. Minyak atsiri merupakan salah satu hasil sisa proses metabolisme dalam tanaman. Minyak tersebut disintesis dari kelenjar (*glandula cell*) pada jaringan tanaman dan ada juga yang terbentuk dalam pembuluh resin (*resin duct*) (Guenther, 1985). Berdasarkan proses biosintesisnya atau pembentukan komponen minyak atsiri di dalam tumbuhan, minyak atsiri dapat dibedakan menjadi dua golongan. Golongan pertama adalah turunan terpena yang terbentuk dari asam asetat melalui jalur biosintesis asam mevalonat. Golongan kedua adalah senyawa aromatik yang terbentuk dari biosintesis asam sikimat melalui jalur fenil propenoid (Augusta, 2000).

a. Biosintesis jalur asam mevalonat

Senyawa terpenoid adalah senyawa hidrokarbon isometrik, terdapat pada lemak/minyak esensial (essential oils), yaitu sejenis lemak yang sangat

penting bagi tumbuhan. Zat-zat terpenoid membantu tumbuhan dalam proses sintesa organik. Harum atau bau dari tanaman disebabkan oleh fraksi minyak esensial. Minyak tersebut merupakan metabolit sekunder yang kaya akan senyawa dengan struktur isopren, yang disebut terpen dan terdapat dalam bentuk diterpen, triterpen, tetraterpen, hemiterpen, dan seskuiterpen.



Gambar 2. Mekanisme biosintesis senyawa terpen melalui jalur asam mevalonat (Breitmaier, 2006)

Mekanisme dari tahap – tahap reaksi biosintesa terpenoid ditunjukkan pada Gambar 2. Asam asetat setelah diaktifkan oleh koenzim A dengan kondensasi klaisen menghasilkan asetoasetat. Senyawa yang dihasilkan ini

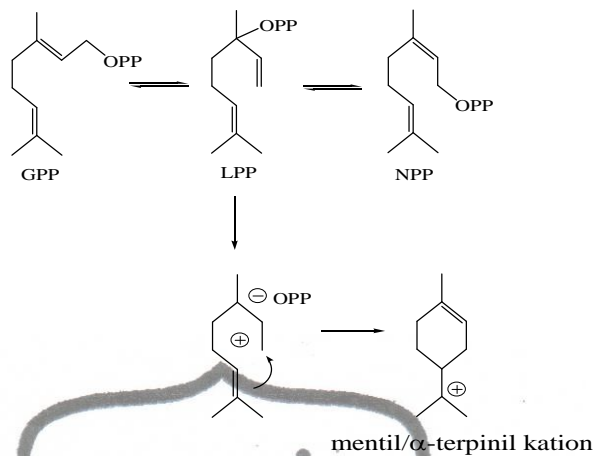
dengan asetil koenzim A melakukan kondensasi jenis aldol menghasilkan rantai karbon bercabang sebagaimana ditemukan pada asam mevalonat, reaksi – reaksi selanjutnya menghasilkan isopentenil pirofosfat (IPP) yang selanjutnya berisomerisasi menjadi dimetil alil pirofosfat (DMAPP) oleh enzim isomerase. IPP sebagai unit isopren aktif bergabung secara kepala ke ekor dengan DMAPP dan penggabungan ini merupakan langkah pertama dari polimerisasi isoprene untuk menghasilkan terpenoid.

Penggabungan ini terjadi karena serangan elektron dari ikatan rangkap IPP terhadap atom karbon dari DMAPP yang kekurangan elektron diikuti oleh penghilangan ion pirofosfat yang menghasilkan Geranil pirofosfat (GPP) yaitu senyawa antara bagi semua senyawa monoterpenoid. Penggabungan selanjutnya antara satu unit IPP dan GPP dengan mekanisme yang sama menghasilkan Farnesil pirofosfat (FPP) yang merupakan senyawa antara bagi semua senyawa seskuiterpen (Lenny, 2006).

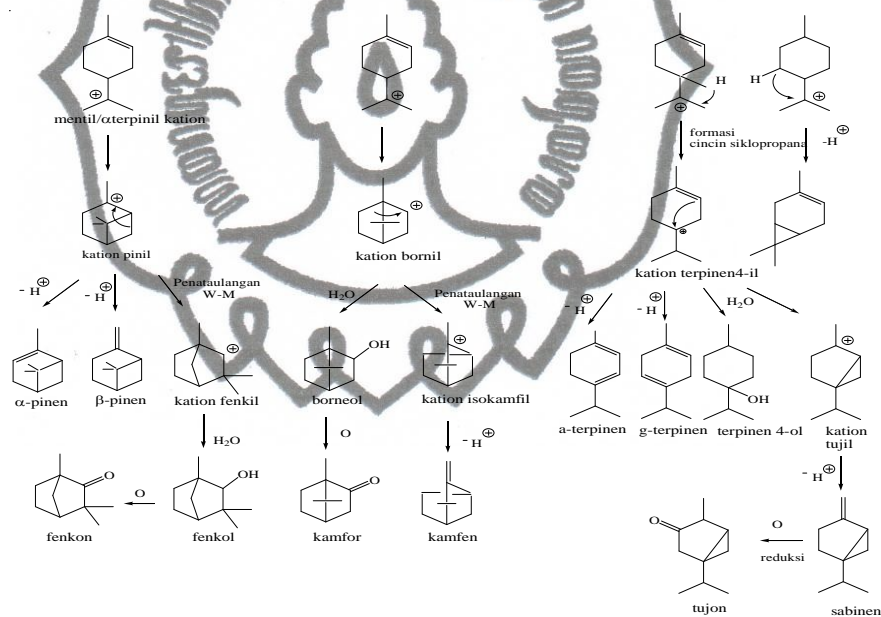
1). Biosintesis monoterpen

Monoterpen merupakan senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari dua satuan isoprena dengan rumus empiris $C_{10}H_{16}$. Monoterpen dapat berupa hidrokarbon tak jenuh atau dapat mempunyai gugus fungsi, dan berupa alkohol, aldehid atau keton. Monoterpen dibagi menjadi menjadi 3 golongan : asiklik, monosiklik dan bisiklik (Padmawinata, 1987).

Monoterpen berasal dari GPP yang mengalami reaksi hidrolisis, isomerisasi, reduksi, oksidasi dan dehidrasi, dari reaksi – reaksi tersebut tidak merubah jumlah atom karbon (Manitto, 1981). Kombinasi dimetilalil phosphat dan isopentenil diphospat menghasilkan geranil diphosphat (GPP). Linalil PP dan Neril PP merupakan isomer dari GPP. Linalil PP merupakan substrat terbaik, yang mempunyai kemampuan berisomerisasi (Dewick, 2002) yang ditunjukkan pada Gambar 3, sehingga akan menghasilkan senyawa kation α -terpinil dan selanjutnya senyawa tersebut akan mengalami siklikasi menjadi turunannya seperti pada Gambar 4.



Gambar 3. Mekanisme perubahan dari GPP menjadi mentil/α-terpinil kation (Dewick, 2002)

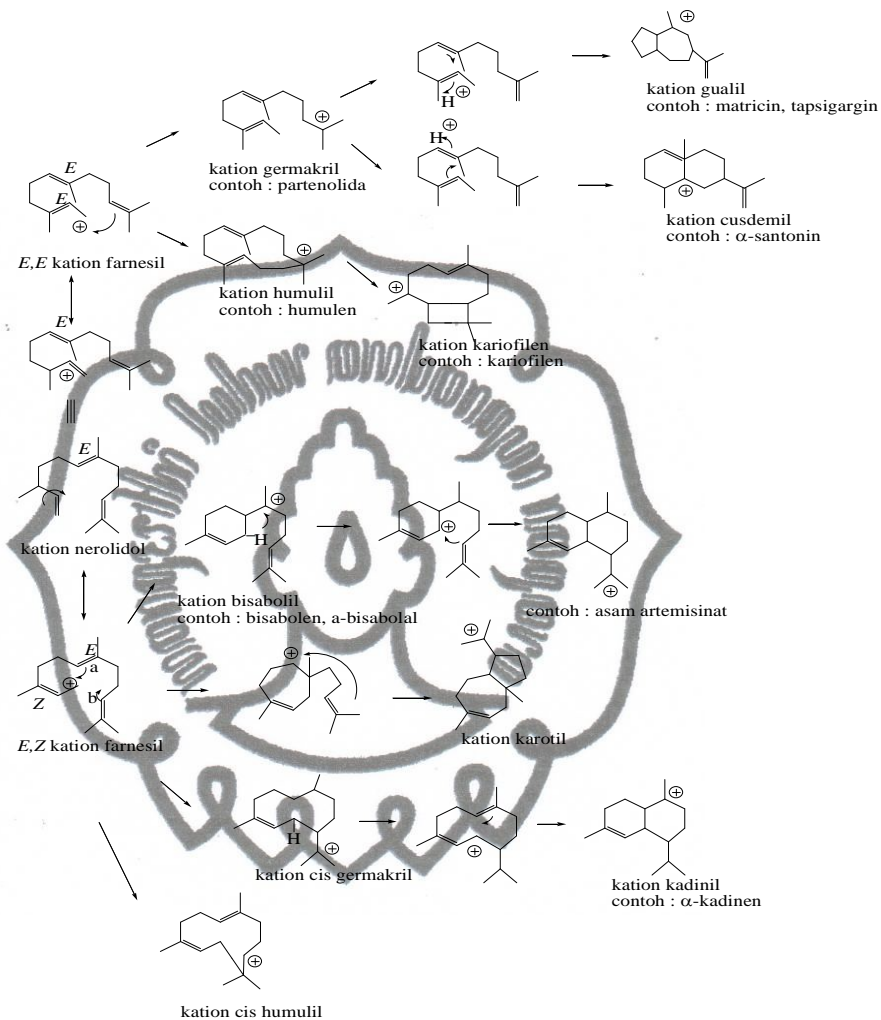


Gambar 4. Mekanisme perubahan mentil/α-terpinil kation menjadi turunannya (Dewick, 2002)

2). Biosintesis seskuiterpen

Seskuiterpen merupakan senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari tiga satuan isoprena dengan rumus empiris $C_{15}H_{24}$ (Ketaren, 1987). Seskuiterpen dibagi menjadi empat golongan yaitu asiklik, monosiklik, bisiklik dan trisiklik. Pada Gambar 5 menunjukkan kerangka karbon dari seskuiterpen berasal dari trans-farnesilpirofosfat dan cis

farnesilpirofosfat yang kemudian mengalami siklisasi dan pengaturan kembali (Dewick, 2002).

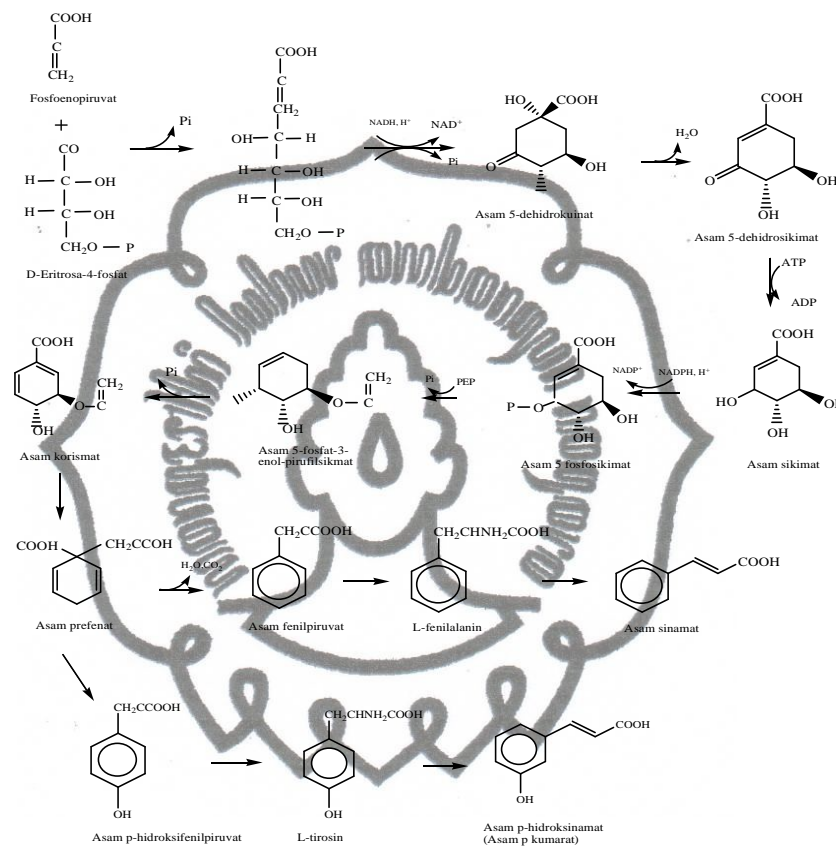


Gambar 5. Pengubahan farnesil kation menjadi turunannya (Dewick, 2002)

b. Biosintesis jalur asam sikimat

Minyak atsiri mengandung senyawa golongan fenil propenoid seperti asam sinamat, asam p-hidroksisinamat atau asam kumarat. Senyawa tipe fenil propenoid berasal dari asam amino aromatik fenilalanin dan tirosin yang disintesis melalui jalur biosintesis asam sikimat yang ditunjukkan pada Gambar 6. Pada jalur biosintesis ini, dua metabolit glukosa, eritrosa 4-fosfat dan fosfoenopiruvat bereaksi dengan NADPH. Senyawa ini membentuk cincin menjadi asam 5 dehidrokuininat dan selanjutnya mengalami perubahan

menjadi asam sikimat. Pengeluaran zat antara melalui fosforilasi oleh asam sikimat akan menghasilkan asam korismat yang berperan sangat penting sebagai titik pusat zat antara. Zat antara ini akan diubah menjadi asam antranilat, triptofan serta asam pefenat yang merupakan bagian nonaromatik.



Gambar 6. Jalur biosintesis senyawa fenil propenoid (Augusta, 2000)

Minyak atsiri dari suatu tanaman memiliki aroma yang berbeda dengan minyak atsiri tanaman lainnya. Berdasarkan perbedaan tersebut minyak atsiri dapat digunakan sebagai bahan pewangi, bahkan beberapa jenis minyak atsiri mampu bertindak sebagai bahan terapi (aroma terapi) atau bahan obat suatu jenis penyakit. Minyak atsiri berperan ganda pada tanaman yaitu memiliki daya tarik terhadap serangga yang membantu penyerbukan bunga dan mengusir serangga perusak.

Minyak atsiri atau minyak eteris adalah istilah yang digunakan untuk minyak yang mudah menguap dan tidak berwarna, akan tetapi bila dibiarkan lebih

lama warnanya akan berubah menjadi kecoklatan karena terjadi oksidasi. Untuk mencegahnya disimpan ditempat yang sejuk dan kering didalam wadah tertutup rapat dan berwarna gelap. Sebagian minyak atsiri terdiri dari persenyawaan hidrokarbon asiklik dan hidrokarbon isosiklik serta hidrokarbon yang telah mengikat oksigen seperti alkohol, fenol dan eter.

3. Isolasi Minyak Atsiri

Perlakuan bahan sebelum destilasi sangat penting seperti perajangan, pelayuan atau pengeringan dan penyimpanan. Perajangan bahan bertujuan agar kelenjar minyak terbuka sebanyak mungkin, sehingga memudahkan penguapan minyak atsiri dari dalam bahan saat destilasi berlangsung, karena minyak atsiri dikelilingi oleh kelenjar minyak, pembuluh – pembuluh dan kantung minyak. Apabila bahan dibiarkan utuh, minyak atsiri hanya dapat diekstrak jika uap air berhasil melalui jaringan tumbuhan dan mendesaknya ke permukaan dengan perlahan (Ketaren, 1987). Pengeringan bertujuan untuk menjamin keawetan, mencegah tumbuhnya jamur, kerja enzim dan kerja bakteri. Proses pengeringan dan penyimpanan mempengaruhi kehilangan minyak atsiri. Sebagian minyak atsiri dalam bahan akan menguap selama pengeringan udara. Kehilangan minyak atsiri selama proses pengeringan lebih besar dibanding pada saat penyimpanan, karena pada saat pengeringan tumbuhan masih mengandung sebagian besar air dalam sel dan dengan proses difusi akan membawa minyak ke permukaan, kemudian menguap. Apabila bahan harus disimpan sebelum destilasi maka penyimpanan dilakukan pada udara kering yang bersuhu rendah dan udara tidak disirkulasikan sehingga dapat mengurangi penguapan minyak dari bahan (Ketaren, 1987).

Minyak atsiri adalah zat cair yang mudah menguap, larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air. Berdasarkan sifat tersebut, maka minyak atsiri dapat diekstrak dengan 4 macam cara yaitu penyulingan (*destillation*), pengepresan (*expression*), ekstraksi dengan pelarut menguap (*solvent ekstraction*) dan absorpsi oleh lemak padat (*enfleurage atau maserage*) (Ketaren, 1968).

Destilasi adalah proses pemisahan komponen yang berupa cairan atau padatan dari dua macam campuran atau lebih berdasarkan perbedaan titik uapnya dan proses ini dilakukan terhadap minyak atsiri yang tidak larut dalam air. Pengambilan minyak atsiri dengan penyulingan dipengaruhi oleh 3 faktor yaitu : besarnya tekanan uap yang digunakan, bobot molekul masing – masing komponen dalam minyak atsiri dan kecepatan keluarnya minyak atsiri dari simplisia (Ketaren, 1985).

Metode destilasi minyak atsiri ada tiga macam yaitu:

a. Destilasi dengan air (*Water Destillation*)

Metode destilasi dengan air, bahan yang akan didestilasi langsung dikontak dengan air mendidih. Bahan tersebut mengapung di atas air atau secara sempurna, tergantung dari berat jenis dan bahan yang didestilasi. Peristiwa pokok yang terjadi pada proses ini yaitu : difusi minyak atsiri dan air panas melalui membran tanaman, hidrolisa terhadap beberapa komponen minyak atsiri dan dekomposisi yang disebabkan oleh panas. Proses hidrodestilasi bahan dan kecepatan penguapan minyak tidak dipengaruhi oleh sifat menguapnya komponen minyak atsiri, melainkan lebih banyak oleh derajat kelarutannya dalam air. Keuntungannya adalah baik untuk menyuling bahan berbentuk tepung dan bunga – bunga yang mudah menggumpal jika kena panas. Kelemahannya yaitu pengestraksian minyak atsiri tidak dapat berlangsung sempurna (Ketaren, 1985).

Bahan yang dibutuhkan merupakan bahan yang kering dan tidak rusak bila di didihkan. Bahan tersebut mengapung di atas air terendam secara sempurna tergantung bobot jenis dan jumlah bahan yang disuling. Jadi, dengan cara ini bahan langsung berhubungan dengan air mendidih. Beberapa bahan yang disuling dengan metode ini adalah serbuk dan bunga – bungan, bahan tersebut akan menggumpal sehingga uap tidak dapat menembus sel – sel tanaman (Guenther, 1987).

b. Destilasi dengan air dan uap (*Water and Steam Distillation*)

Pada metode destilasi air dan uap, bahan diletakkan di atas saringan berlubang. Ketel suling diisi dengan air sampai permukaan air tidak berada jauh di

bawah saringan. Air dapat dipanaskan dengan berbagai cara yaitu dengan uap jenuh yang basah dan bertekanan rendah. Ciri khas metode ini adalah uap selalu dalam keadaan basah, jenuh dan tidak terlalu panas. Keuntungan menggunakan sistem tersebut adalah karena uap berpenetrasi secara merata ke dalam jaringan bahan dan suhu dapat dipertahankan sampai suhu 100° C. Lama penyulingan relatif singkat, rendemen minyak lebih besar dan mutunya lebih baik jika dibandingkan dengan minyak hasil penyulingan dengan air dan bahan yang disuling tidak dapat menjadi gosong (Ketaren, 1985). Kerugiannya adalah jumlah uap yang dibutuhkan cukup besar dan waktu penyulingan lebih lama, selain itu akan mengembun dalam jaringan tanaman sehingga bahan tanaman bertambah basah dan mengalami resinifikasi (Guenther, 1987).

c. Destilasi dengan uap (*Steam Distillation*)

Metode ini pada prinsipnya sama dengan air dan uap kecuali air tidak diisikan dalam labu. Uap yang digunakan uap jenuh pada tekanan lebih dari 1 atmosfer. Uap dipisahkan melalui pipa uap bertingkat yang berpori yang terletak di bawah bahan dan uap bergerak ke atas melalui bahan terletak di atas saringan (Ketaren, 1987).

Sistem destilasi ini baik digunakan untuk mengekstrak minyak dari biji – bijian, akar dan kayu – kayuan yang umumnya mengandung komponen minyak yang bertitik didih tinggi. Sistem penyulingan ini tidak baik dilakukan terhadap bahan yang mengandung minyak atsiri yang mudah rusak oleh pemanasan dan air.

Minyak yang dihasilkan dari destilasi ini baunya akan sedikit berubah dari bau asli alamiah, terutama minyak atsiri yang berasal dari bunga (Ketaren, 1985).

Pengaruh yang penting selama destilasi berlangsung adalah suhu terhadap minyak atsiri. Pada dasarnya semua senyawa penyusun minyak atsiri tidak stabil atau peka terhadap suhu tinggi. Itulah sebabnya untuk memperoleh kualitas minyak atsiri diupayakan pada suhu pemanasan yang rendah. Namun, bila suhu pemanasan tinggi maka panas destilasi diusahakan dalam waktu sesingkat mungkin. Pada destilasi air atau penyulingan uap dan air bila tekanan yang digunakan seperti tekanan atmosfer luar maka suhu pemanasan yang digunakan sekitar 100 °C (Sastrohamidjojo, 2004).

4. Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

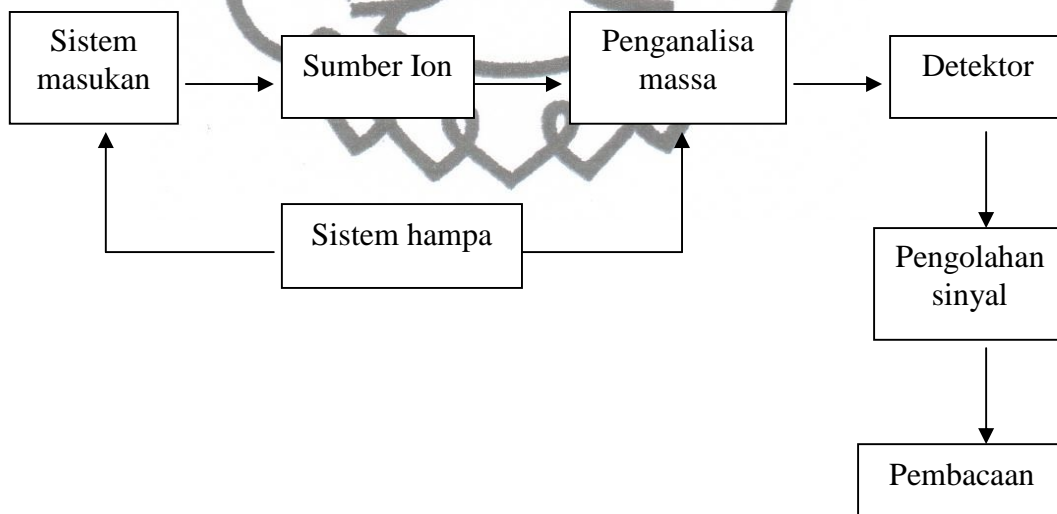
Perkembangan teknologi instrumentasi menghasilkan alat yang merupakan gabungan dari dua sistem dengan prinsip dasar yang berbeda satu sama lain tetapi dapat saling melengkapi, yaitu gabungan kromatografi gas dan spektrofotometri massa (GC-MS). Pada alat GC-MS ini, kedua alat dihubungkan dengan satu interfase. GC berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan MS berfungsi untuk mendeteksi masing – masing molekul komponen yang telah dipisahkan pada sistem GC (Sastrohamidjojo, 1991).

GC-MS merupakan suatu instrumen yang tepat untuk menganalisis dan mengidentifikasi komponen senyawa kimia suatu bahan alam. Kromatografi ini dapat menentukan berat molekul dari suatu senyawa organik dan dapat menentukan struktur senyawa organik. GC-MS juga dapat menentukan konsentrasi (%) senyawa yang terkandung dalam suatu ekstrak bahan alam. Identifikasi komponen dengan analisa kualitatif, dapat dilakukan dengan membandingkan kromatogram dengan senyawa-senyawa referensi standar. Sedangkan analisa kuantitatif dalam GC-MS yaitu menentukan jumlah % dari komponen-komponen yang terpisah dari suatu komponen, dapat dihitung dari luas puncak kromatogram (Agusta, 2000).

Dalam GC-MS, cuplikan diinjeksikan kedalam injektor. Aliran gas dari alat pengangkut akan membawa cuplikan yang telah teruapkan masuk kedalam kolom. Gas pengangkut yang sering dipakai dalam GC-MS adalah H_2 , N_2 , Ar dan He. Gas ini berfungsi sebagai fase gerak, membawa cuplikan yang telah teruapkan untuk masuk ke dalam kolom. Gas pengangkut yang digunakan harus memenuhi persyaratan dan dasar pemilihannya antara lain: sesuai dengan detektor, inert atau tidak bereaksi dengan sampel, pelarut dan material dalam kolom, murni dan mudah dipengaruhi serta murah (Padmawinata, 1991).

Pada GC-MS, pemisahan terjadi ketika sampel diinjeksikan ke dalam fase gerak. Fase gerak membawa sampel melalui fase diam yang berada dalam kolom. Sampel dalam fase gerak berinteraksi dengan fase diam dengan kecepatan yang berbeda – beda. Saat terjadi interaksi, yang tercepat akan keluar dari kolom lebih

dulu, sementara yang lambat akan keluar paling akhir. Komponen – komponen yang telah terpisah kemudian menuju ke detektor. Detektor akan memberikan sinyal dan kemudian ditampilkan dalam komputer sebagai kromatogram. Dalam detektor, selain memberikan sinyal sebagai kromatogram komponen – komponen yang telah terpisah akan ditembak elektron sehingga terpecah menjadi fragmen – fragmen dengan perbandingan massa dan muatan tertentu (m/z). Fragmen – fragmen tersebut ditampilkan komputer sebagai spektra massa, dimana sumbu x menunjukkan perbandingan m/z sedangkan sumbu y menunjukkan intensitas. Dari spektra tersebut, dapat diketahui struktur senyawa dengan membandingkannya dengan spektra massa standar dari literatur yang tersedia dalam komputer. Pendekatan pustaka terhadap spektra massa yang diperoleh dapat digunakan untuk identifikasi bila indeks kemiripan atau *similarity indeks* (SI) berada pada rentangan $> 80\%$ (Howe, I dan D.H Willliams, 1981). Gambar 7 menunjukkan diagram GC-MS.

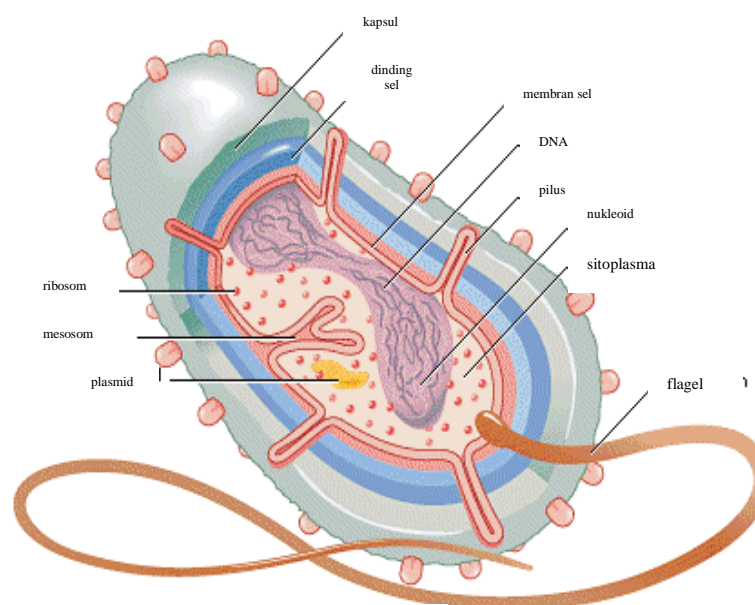


Gambar 7. Diagram GC-MS
(Hendayana, 1994)

Analisis GC-MS merupakan metode yang cepat dan akurat untuk memisahkan campuran yang rumit, mampu menganalisis campuran dalam jumlah kecil dan menghasilkan data yang berguna mengenai struktur serta identitas senyawa organik (Augusta, 2000).

5. Bakteri

Bakteri merupakan organisme yang paling banyak jumlahnya dan lebih tersebar luas dibandingkan makhluk hidup yang lain. Bakteri merupakan mikrobia prokariotik multiselular, termasuk kelas Schizomycetes, berkembang biak secara asexual dengan pembelahan sel. Bakteri tidak berklorofil kecuali beberapa yang bersifat fotosintetik. Cara hidup bakteri ada yang dapat hidup bebas, parasitik, saprofitik, patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Habitatnya tersebar luas di alam, dalam tanah, atmosfer, di dalam lumpur, dan di laut. Bentuk bakteri juga dapat dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Bakteri dapat mengalami involusi, yaitu perubahan bentuk yang disebabkan faktor makanan, suhu, dan lingkungan yang kurang menguntungkan bagi bakteri. Selain itu dapat mengalami pleomorfi, yaitu bentuk yang bermacam-macam dan teratur walaupun ditumbuhkan pada syarat pertumbuhan yang sesuai (Sumarsih, 1993). Bakteri secara tradisional dibagi dalam dua golongan besar yaitu bakteri patogen dan non patogen. Bakteri patogen merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit dan bakteri non patogen adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit (Shulman, 1994). Penampang dari bakteri dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Penampang Bakteri

(Microsoft Encarta Reference Library
Premium, 2005)

Bakteri dapat digolongkan menjadi dua kelompok yaitu gram positif dan gram negatif. Beberapa ciri bakteri ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Ciri bakteri gram positif dan gram negatif.

Ciri	Perbedaan	
	Gram positif	Gram negatif
Struktur dinding sel	<ul style="list-style-type: none"> • Tebal (15 - 80 nm) • Berlapis tunggal (mono) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tipis (10 - 15 nm) • Berlapis tiga (multi)
Komposisi dinding sel	<ul style="list-style-type: none"> • Kandungan lipid rendah (1 - 4%) • Peptidoglikan ada sebagai lapisan tunggal; komponen utama merupakan lebih dari 50% berat kering pada beberapa sel bakteri. • Memiliki asam teikoat 	<ul style="list-style-type: none"> • Kandungan lipid tinggi (11 - 22%) • Peptidoglikan ada di dalam lapisan kaku sebelah dalam; jumlahnya sedikit; merupakan sekitar 10% berat kering • Tidak memiliki asam teikoat
Kerentanan terhadap penisilin	Lebih rentan	Kurang rentan
Resistensi terhadap gangguan fisik	Lebih resisten	Kurang resisten
Persyaratan nutrisi	Relatif murni pada banyak spesies	Relatif sederhana

(Pelczar dan Chan, 1986)

Sel – sel individu bakteri dapat berbentuk seperti elips, bola, batang (silindris), atau spiral (heliks). Masing – masing ciri ini penting dalam mencirikan morfologi suatu spesies. Berdasarkan bentuknya, bakteri dibagi menjadi tiga golongan besar, yaitu:

a. Kokus (*Coccus*) adalah bakteri yang berbentuk bulat seperti bola, dan mempunyai beberapa variasi sebagai berikut:

- 1). *Sarcina*, jika bergerombol membentuk kubus.
- 2). *Staphylococcus*, jika bergerombol.
- 3). *Streptococcus*, jika bergandengan membentuk rantai.
- 4). *Mikrococcus*, jika kecil dan tunggal.
- 5). *Diplococcus*, jika bergandanya dua-dua.
- 6). *Tetracoccus*, jika bergandengan empat dan membentuk bujur sangkar.

- b. Basil (*Bacillus*) adalah kelompok bakteri yang berbentuk batang atau silinder, dan mempunyai variasi sebagai berikut:
 - 1). *Diplobacillus*, jika bergandengan dua-dua.
 - 2). *Streptobacillus*, jika bergandengan membentuk rantai.
- c. Spiril (*Spirillum*) adalah bakteri yang berbentuk lengkung dan mempunyai variasi sebagai berikut:
 - 1). *Vibrio*, (*bentuk koma*), jika lengkung kurang dari setengah lingkaran.
 - 2). *Spiral*, jika lengkung lebih dari setengah lingkaran.

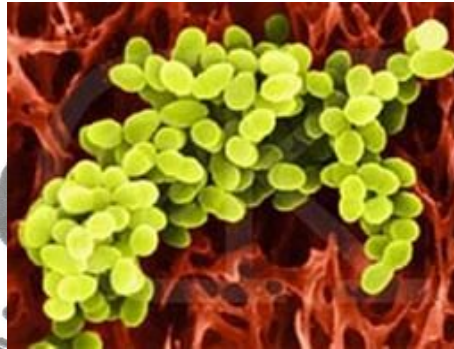
Beberapa bakteri gram negatif adalah *Enterobacter cloacae*, *Legionella pneumophila*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, sedangkan bakteri gram positif adalah *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*.

Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri biasanya merupakan keracunan makanan baik tipe infeksi maupun tipe intoksikasi. Tipe infeksi terjadi apabila bakteri di dalam makanan masuk dan berkembangbiak dalam saluran pencernaan makanan, mencapai usus dan menimbulkan penyakit, sedangkan tipe intoksikasi adalah bakteri dalam makanan berkembang biak dan menghasilkan toksin. Toksin bersama makanan masuk ke dalam saluran pencernaan mencapai usus. Toksin diabsorpsi masuk ke dalam sel – sel epitel dinding usus dan yang larut dalam air dapat menyebar luas melalui saluran darah. Toksin yang larut dalam minyak atau lemak masuk melalui saluran getah bening dan cairan jaringan sehingga menyebabkan keracunan makanan. Karbohidrat, protein, lemak dan nutrisi lainnya dalam pangan merupakan sumber media yang cocok bagi pertumbuhan bakteri. *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* dan *Campylobacter* adalah beberapa jenis bakteri yang banyak menimbulkan keracunan yang mengkontaminasi makanan.

a. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus berasal dari perkataan *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur dan kokus yang berarti benih bulat. *Staphylococcus aureus* adalah sel

berbentuk bulat dengan diameter 0,8 – 1,0 μm , tersusun dalam kelompok tidak teratur dan tidak bergerak, tidak membentuk spora dan merupakan bakteri gram positif (Anonim, 1994). Bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9. *Staphylococcus aureus*
(Tortora, et. al., 1995)

Menurut Salle (1961) sistematika *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteryales
Suku	: Mycrococcaceae
Marga	: <i>Staphylococcus</i>
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus hidup sebagai saprofit di dalam membran mukosa dari tubuh manusia dan hewan seperti hidung, mulut dan tenggorokan dan dapat mengeluarkan batuk dan bersin. *Staphylococcus aureus* merupakan agen infeksi yang dapat menyerang setiap jaringan dan organ tubuh. Timbulnya penyakit dengan tanda – tanda yang khas yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. Bakteri ini juga sering terdapat pada pori – pori permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Selain dapat menyebabkan intoksikasi, *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan bermacam – macam infeksi seperti seperti jerawat, bisul, meningitis, osteomielitis, pneumoniai dan mastitis pada manusia (Supardi, 1999).

Staphylococcus aureus mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan bakteriologik dalam keadaan aerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37° C, tapi paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar 25° C. Pada pembenihan padat membentuk koloni bulat, halus, mengkilat, biasanya membentuk koloni abu – abu hingga kuning emas.

Staphylococcus aureus bersifat meragikan karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tapi tidak menghasilkan gas. Bakteri tersebut menimbulkan penyakit melalui kemampuan berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan karena kemampuannya menghasilkan banyak zat ekstraseluler antara lain :

a. Eksotoksin.

Suatu campuran termolabil yang dapat disaring dan dimatikan bagi binatang pada penyuntikan, menyebabkan nekrosis pada kulit dan mengandung beberapa hemolisin yang dapat larut dan dipisahkan dengan elektroforesis.

b. Leukosidin.

Suatu zat yang dapat larut dan mematikan sel darah putih pada berbagai spesies binatang yang kontak dengannya.

c. Enterotoksin.

Suatu zat yang dapat larut yang dihasilkan oleh strain tertentu merupakan penyebab penting keracunan makanan.

d. Koagulase.

Staphylococcus aureus mampu menghasilkan koagulase yaitu suatu enzim yang dapat menggumpalkan plasma. Koagulase ini dapat membentuk fibrin pada permukaan *staphylococcus*, ini bisa mengubah ingestinya oleh sel fagositik atau pengrusakan pada sel fagosit.

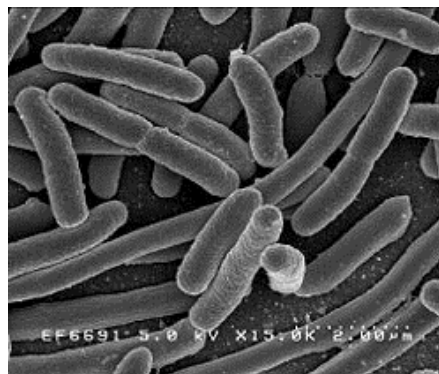
e. Enzim lain.

Zat lain yang dihasilkan adalah hialuronidase. Ini adalah faktor penyebab staphylokinase yang mengakibatkan fibrinolisis tetapi bekerja jauh lebih lambat daripada streptokinase, lipase dan betalaktamase, toksin ekspoliatif yang mengakibatkan endroma lepuh kulit (Warsa, 2004).

Kepekaan *Staphylococcus aureus* terhadap banyak obat antimikroba berbeda - beda. Resistensi bakteri diantaranya sering membentuk β -laktamase, di bawah kendali plasmid, dan menyebabkan organisme resisten terhadap beberapa penisilin (penisilin G, ampicilin, tikarsilin dan obat – obat sejenis). Plasmid dipindahkan melalui transduksi dan mungkin pula melalui konjugasi. Resistensi terhadap nafsilin, metisilin dan oksasilin tidak tergantung pada pembentukan β laktamase. Gen tersebut mungkin berada pada kromosom dan ekspresinya bermacam – macam. Mekanisme resistensi terhadap nafsilin dikaitkan dengan tidak ada atau sukar dicapainya protein pengikat penisilin pada organisme itu (Jawetz, et. al., 2005).

b. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek, berderet seperti rantai, dapat memfermentasi glukosa dan laktosa membentuk asam dan gas. *Escherichia coli* dapat tumbuh baik pada media Mc.Conkey dan dapat memecah laktosa dengan cepat, juga dapat tumbuh pada media agar. Dapat merombak karbohidrat dan asam lemak menjadi asam dan gas serta dapat menghasilkan gas karbondioksida dan hidrogen (Pelczar dan Chan,1998). *Escherichia coli* berbentuk batang pendek (cocobasil), gram negatif dengan ukuran $0,4 - 0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$. Sebagian besar bersifat motil (bergerak) dan beberapa strain memiliki kapsul (Supardi, 1999). Bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 10. *Escherichia coli*
(Tortora, et. al., 1995)

Menurut Salle (1961) sistematika *Escherichia coli* adalah sebagai berikut :

Divisi	: Protophyta
Subdivisi	: Schizomycetea
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Escherichia</i>
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>

Escherichia coli banyak ditemukan di dalam usus halus manusia sebagai flora normal, tetapi bila kesehatan menurun, bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan. *Escherichia coli* umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru – paru, saluran empedu dan saluran otak (Jawetz, et. al., 2005). Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit seperti diare, infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis pada bayi yang baru lahir dan infeksi luka (Karsinah, 1994). *Escherichia coli* memproduksi enterotoksin yang tahan panas yang dapat menyebabkan diare ringan, sedangkan enterotoksin yang tidak tahan panas dapat menyebabkan sekresi air dan klorida ke dalam lumen usus dan menghambat absorpsi natrium (Jawetz, et. al., 2005).

6. Antibakteri

Antibakteri adalah suatu efek antibiotik yang digunakan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yakni aktivitas bakteriostatik dan aktivitas bakterisidal. Aktivitas bakteriostatik adalah aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri tetapi tidak membunuh bakteri patogen, sedangkan aktivitas bakterisidal adalah aktivitas bakteri dalam kisaran luas dapat membunuh bakteri patogen (Pelczar dan Chan, 1988). Antibakteri dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Bahan antibakteri dapat bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah, namun bersifat bakterisidal dalam konsentrasi tinggi (Pelczar dan Chan, 1988: Lay, 1994).

commit to user

Menurut Jacquelyn (1999) mekanisme kerja antimikroba dapat dibagi menjadi lima cara, yaitu :

a. Penghambat sintesis dinding sel

Antibakteri berperan sebagai penghambat pembentukan peptidoglikan pada dinding sel bakteri. Hal ini menyebabkan terjadinya kerusakan sel akibat tidak adanya lapisan pelindung. Kerja antibakteri ini dapat dilihat pada penisilin dan sefalosporin.

b. Perusak membran sel

Antibakteri ini berperan merusak permeabilitas membran sel yang menyebabkan penghambatan transport nutrisi dari dalam menuju sel. Hal ini menyebabkan pertumbuhan sel terhambat. Model antibakteri ini dapat dilihat pada polimiksin dan tirosidin.

c. Penghambat sintesis protein

Antibakteri ini bekerja untuk mencegah pembentukan polipeptida dengan cara menghambat pembentukan molekul sederhananya berupa peptida, contohnya aminoglikosida dan tetrasiklin.

d. Penghambat sintesis asam nukleat

Dengan cara merusak enzim – enzim persintesis asam nukleat.

e. Antimetabolit

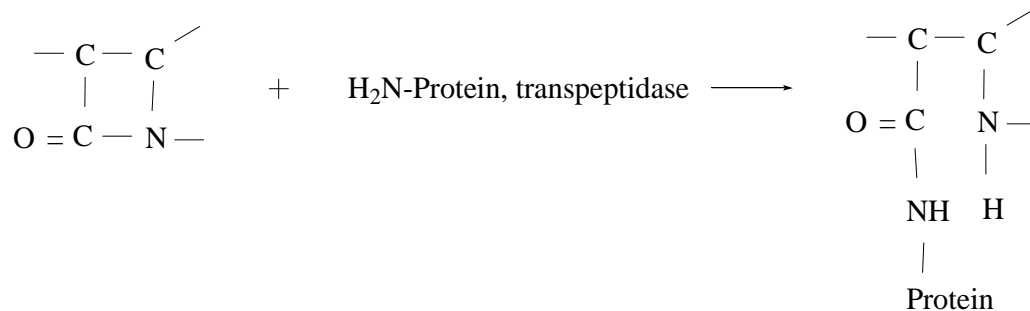
Menghambat reaksi metabolisme sel bakteri dengan menghasilkan *inhibitory enzyme competition*.

Beberapa kelompok utama bahan antibakteri kimiawi adalah fenol dan persenyawaan fenolat (fenol, *o*-Kresol, *m*-Kresol, *p*-Kresol, *o*-fenilfenol, heksilresorsinol dan heksaklorofen), alkohol (etil alkohol dan metil alkohol), halogen dan persenyawaannya (iodium, gas klor, hipoklorit dan kloramin), logam berat dan persenyawaannya (merkuri, perak tembaga, mertiolat, merkurokrom dan metafen), deterjen (deterjen anionik dan kationik), aldehid (glutaraldehid dan formaldehid), kemosterilisator gas (Etilenoksida) (Pelczar dan Chan, 1988).

7. Antibiotik

Antibiotik adalah senyawa kimia khas yang dihasilkan oleh organisme hidup dan dalam kadar rendah mampu menghambat proses penting dalam kehidupan satu spesies atau lebih mikroorganisme (Siswandono dan Soekarjo, 2000).

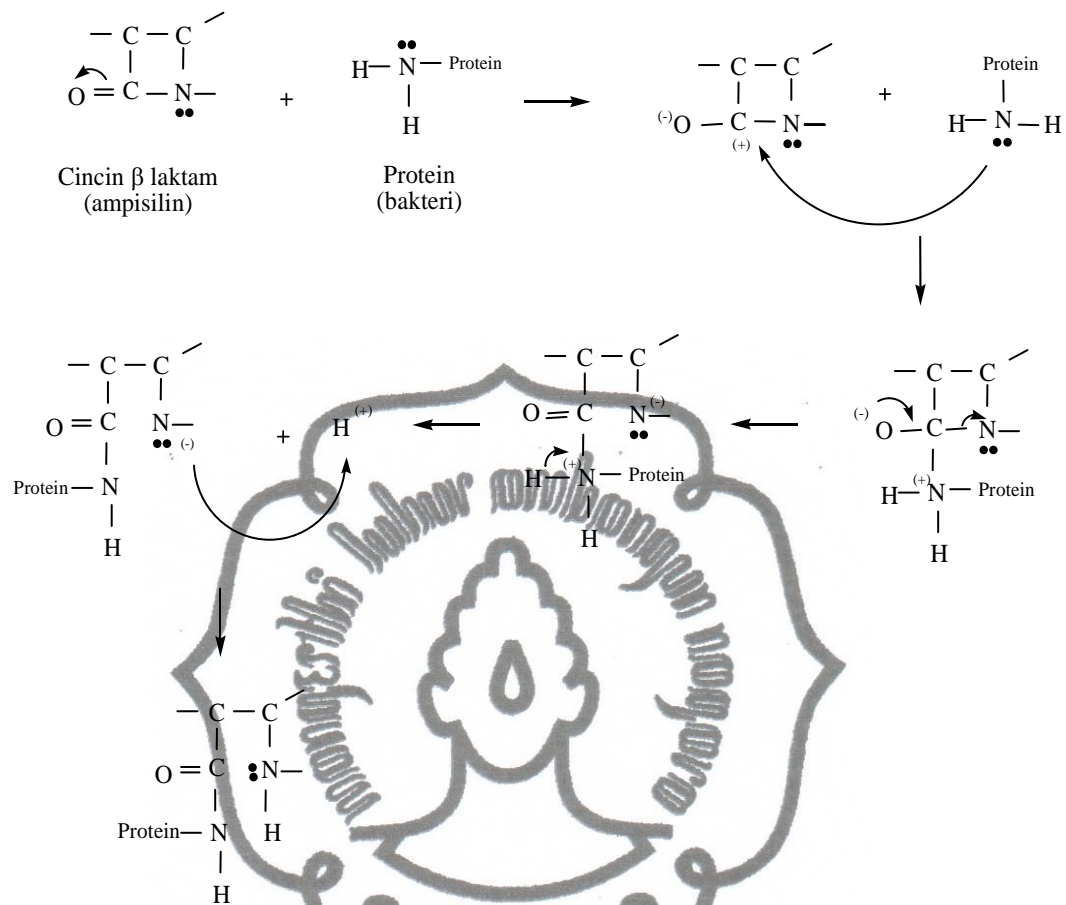
Ampisilin adalah antibiotik golongan penisilin semisintetik, dipakai secara peroral dan parenteral, aktif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Absorpsi penisilin pada pemberian peroral umumnya berlangsung selama 2 jam, tetapi jumlah ampisilin yang diabsorpsi sangat bervariasi (20 – 70% dosis). Absorpsi ampisilin yang tidak sempurna ini disebabkan oleh sifat – sifat amfoternya serta keterbatasan kelarutan dalam air dan kecepatan disolusinya. Absorpsi diperlambat dengan adanya makanan, tetapi tidak mempengaruhi jumlah total ampisilin yang diabsorpsi. (Ritschel, 1976). Ampisilin mengandung cincin β laktam, merupakan senyawa pengasili kuat dan mempunyai kespesifikan tinggi terhadap gugus amino serin dari enzim transpeptidase, suatu enzim yang mengkatalisis tahap akhir sintesis dinding sel bakteri. Reaksi asilasi gugus amino serin dari enzim transpeptidase oleh turunan antibiotik β laktam di tunjukkan pada gambar 11.



Gambar 11. Reaksi asilasi gugus amino serin dari enzim transpeptidase oleh turunan antibiotik β laktam (Siswandono dan Soekarjo, 2000)

Mekanisme reaksi asilasi gugus amino serin dari enzim transpeptidase oleh turunan antibiotik β laktam adalah sebagai berikut :

commit to user



Gambar 12. Mekanisme reaksi asilasi gugus amino serin dari enzim transpeptidase (reaksi substitusi dengan amina) (Fessenden dan Fessenden, 1989)

Cincin β laktam aktif melawan pertumbuhan bakteri. Perbedaan pada kepekaan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif terhadap berbagai penisilin tergantung pada perbedaan struktur dinding selnya (misalnya, sejumlah peptidoglikan, adanya reseptor dan lipid, sifat anyaman dinding sel, aktivitas enzim otolitik) yang menentukan penetrasi, ikatan dan aktivitas obat.

Resistensi terhadap ampicillin ditentukan oleh produksi enzim perusak cincin ampicillin yang dihasilkan oleh organisme (β laktamase). β laktamase membuka cincin β laktam ampicillin dan meniadakan aktivitas mikrobanya. β laktamase telah dibuat pada beberapa spesies bakteri gram positif dengan media plasmid dan gram negatif dengan mengkode kromosomal. Asam klavulat, sulbaktam dan tazobaktam adalah penghambat β laktamase yang mempunyai

aktivitas tertinggi. Penghambat ini melindungi ampisilin terhadap proses hidrolisis ampisilin oleh β laktamase (Jawetz *et. al.*, 2005).

8. Media

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat makanan yang diperlukan untuk menumbuhkan suatu mikroorganisme dalam rangka isolasi memperbanyak perhitungan dan pengujian sifat fisiologik suatu mikroorganisme. Untuk mendapatkan lingkungan hidup yang cocok bagi pertumbuhan bakteri atau jamur, maka media harus memiliki syarat dalam hal sebagai berikut :

a. Susunan makanan.

Suatu media yang digunakan untuk pertumbuhan harus ada air, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, vitamin dan gas.

b. Tekanan Osmose

Disini antara sel mikroba dengan media harus memiliki tekanan osmose yang sama, oleh karena itu untuk pertumbuhannya bakteri atau jamur membutuhkan media yang isotonis. Bila sel pada media yang bersifat hipertonis, sel bakteria akan terhidrasi atau kerap disebut sebagai peristiwa plasmolisis. Bila sel pada media yang bersifat hipotonis, maka akan terjadi peristiwa plasmoptilis yaitu bahan yang memiliki tonisitas rendah akan masuk kedalam membran sel yang mengakibatkan sel menggelembung dan akhirnya pecah.

c. Derajat keasaman (pH)

Pada umumnya mikroorganisme membutuhkan pH sekitar 7 yaitu pH netral.

d. Temperatur

Pertumbuhan yang optimal membutuhkan temperatur tertentu. Pada umumnya mikroorganisme yang patogen membutuhkan temperatur tertentu sekitar 37 °C sesuai dengan temperatur tubuh.

e. Sterilitas

Sterilitas media merupakan suatu syarat yang sangat penting. Pemeriksaan mikrobiologis tidak mungkin dilakukan bila media yang digunakan tidak steril, Karena mikroorganisme yang diidentifikasi atau diisolasi tidak akan dibedakan dengan pasti apakah mikroorganisme tersebut berasal dari material

yang diperiksa ataukah hanya kontaminan. Untuk mendapatkan media yang steril maka setiap tindakan (pengambilan media, penuangan media, dll) dikerjakan secara aseptik dan alat yang digunakan harus steril.

Penggolongan media berdasarkan isi menurut Anonim (1993) di bagi menjadi 2 yaitu :

a. Media basal

Media ini digunakan sebagai bahan dasar untuk membuat media lain yang lebih komplek. Media basal dibedakan menjadi 2, yaitu :

- 1). Media basal padat : kaldu agar, TSA (Tryptone Soya Agar).
- 2). Media basal cair : air pepton, kaldu pepton, NA (Nutrien Agar).

Komposisi dari Nutrien Agar adalah ekstrak beef, pepton, agar, NaCl, air destilat dan berada pada PH 6,8 – 7,0.

b. Media campuran

Adalah media selain media basal juga ditambahkan berbagai macam zat baik organik maupun anorganik, sesuai dengan kebutuhan bakteri.

9. Uji Aktivitas Antibakteri

Metode yang umum digunakan untuk menguji daya antibakteri diantaranya (Lorian, 1980) :

a. Metode pengenceran agar

Pada metode ini zat antibakteri dicampur dengan media yang kemudian diinokulasi dengan bakterinya. Dasar pengamatannya adalah tumbuh atau tidaknya bakteri. Metode ini dapat berupa :

- 1). Cara pengenceran serial dalam tabung (dilusi cair)

Antibakteri yang akan diuji aktivitasnya diencerkan secara serial dengan metode pengenceran di dalam media cair dan selanjutnya diinokulasi dengan bakteri uji. Setelah diinkubasi pada suhu 37° C selama 18 – 24 jam, aktivitas zat antibakterinya dapat ditentukan dengan Konsentrasi Hambat Minimal maupun Konsentrasi Bunuh Minimal.

2). Cara penipisan lempeng agar (dilusi padat)

Zat yang akan diuji aktivitas antibakterinya diencerkan secara serial dengan metode pengenceran di dalam media agar. Agar bersuhu 40 - 50°C, kemudian dituangkan ke dalam bakteri dan diinkubasi pada suhu dan jangka waktu yang sesuai dengan pertumbuhan bakteri yang akan diuji, aktivitas zat antibakterinya dapat ditentukan dengan Konsentrasi Hambat Minimal maupun Konsentrasi Bunuh Minimal.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) zat antibakteri yang akan diuji adalah kadar terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) zat antibakteri adalah kadar terendah yang dapat membunuh bakteri.

b. Metode difusi agar

Pada metode ini zat yang akan ditentukan aktivitas antibakterinya berdifusi pada lempeng agar yang telah ditanami bakteri yang diuji. Dasar pengamatannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan disekeliling cakram atau silinder yang berisi zat antibakterinya. Metode difusi ini dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya :

1). Cara Kirby Bauer

Diambil beberapa koloni bakteri dari pertumbuhan 24 jam pada agar kemudian disuspensikan ke dalam 0,5 ml media cair, diinkubasi pada suhu 37° C, kemudian ditambah aquades steril hingga memenuhi standar Brown III (10^8 CFU/ ml). Dengan menggunakan kapas lidi steril, suspensi bakteri dioleskan pada permukaan agar secara merata, kemudian diletakkan kertas samir yang berisi antibiotik dan diinkubasi pada suhu 37° C, selama 18 – 24 jam. Pengamatan dilakukan atas ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling kertas samir.

2). Cara sumuran

Pada media agar yang telah ditanami mikroba dibuat lubang kemudian diisi dengan zat antibakteri. Modifikasi dari cara ini adalah dengan meletakkan silinder pada medium agar, kemudian diisi dengan zat antibakteri. Setelah diinkubasi pada suhu dan jangka waktu yang sesuai

dengan jenis bakterinya pengamatan dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang atau silinder.

c. Metode turbidimetri

Pada metode ini pengamatan aktivitas antibakteri didasarkan atas kekeruhan yang terjadi di dalam media pembenihan. Pertumbuhan bakteri juga dapat ditentukan dari perubahan yang terjadi pada sebelum dan sesudah inkubasi yang diukur dengan mengukur serapannya dengan spektrofotometri. Adanya pertumbuhan bakteri ditandai dengan peningkatan jumlah sel bakteri yang mengakibatkan meningkatnya kekeruhan. Kekeruhan yang terjadi umumnya berbanding lurus dengan serapannya yang berarti semakin banyak jumlah sel, maka akan terlihat semakin keruh dan serapannya akan semakin besar.

B. Kerangka Pemikiran

Daun lampes (*Ocimum sanctum* L.) merupakan tumbuhan obat dari famili Lamiaceae yang berkhasiat untuk penyakit diare, rematik, sariawan, gangguan ginjal, koreng, jerawat, antipiretik, ekspektoran, diuretik, diaforetik, laktagoga, emenagoga, karminatik. Masih sedikit informasi tentang kandungan kimia serta aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen dari daun lampes. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengetahui komponen kimia dan menguji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun lampes.

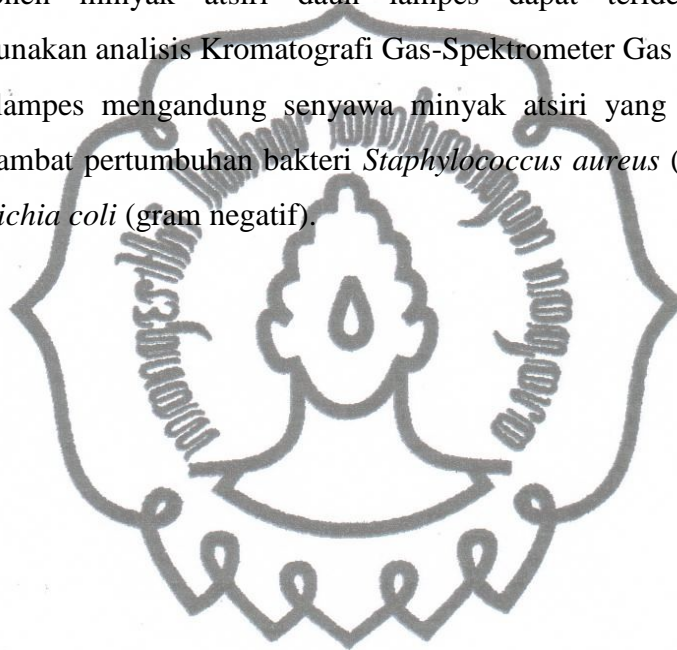
Tahap penelitian yang dilakukan dengan mengisolasi minyak atsiri daun lampes dengan metode destilasi stahl. Dalam metode ini terjadi difusi minyak atsiri dan air melalui membran tanaman, hidrolisa terhadap beberapa komponen minyak atsiri yang sudah dibebaskan dari jaringan tanaman terbawa oleh uap air. Identifikasi komponen kimia minyak atsiri dengan analisis GC-MS. Berdasarkan data GC-MS akan diperoleh informasi struktur senyawa yang terdeteksi dalam minyak atsiri daun lampes.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar kemudian diperoleh diameter zona hambatan. Hasilnya dibandingkan dengan antibiotik sintesis. Pada uji difusi yang menunjukkan adanya suatu hambatan pada

pertumbuhan bakteri, kemudian dilanjutkan dengan membuat variasi konsentrasi minyak atsiri sehingga akan diperoleh KHM.

C. Hipotesis

1. Minyak atsiri daun lampes dapat diisolasi dengan metode destilasi stahl dan dapat ditentukan kadarnya.
2. Komponen minyak atsiri daun lampes dapat teridentifikasi dengan menggunakan analisis Kromatografi Gas-Spektrometer Gas (GC-MS).
3. Daun lampes mengandung senyawa minyak atsiri yang berpotensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif).



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental kuantitatif di laboratorium. Isolasi minyak atsiri daun lampes dilakukan dengan metode destilasi stahl. Identifikasi komponen kimia minyak atsiri dilakukan pendekatan struktur dengan metode spektrometri. Spektrometer yang digunakan merupakan gabungan dari kromatografi gas dan spektrometer massa (GC-MS). Uji aktivitas minyak atsiri dilakukan dengan metode difusi.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Sub. Lab. Kimia dan Sub. Lab. Biologi Laboratorium Pusat Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret, selama 3 bulan dari bulan Maret - Mei 2009

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah destilasi stahl, labu alas bulat 750 ml (pyrex), gelas beker 250 ml (pyrex), gelas ukur 10 ml dan 50 ml (pyrex), selang air, waterpump, statif dan klem, GCMS-QP2010S SHIMADZHU, Inkubator suhu 4° C (J.P. SELECTA Hotcold M), Inkubator suhu 37° C (J.P. SELECTA Hotcold M), timbangan elektrik (Analytical Balance Denver Instrument), autoklaf (J.P. SELECTA Hotcold M), hot plate-stirer (IKA Labortechnik), jangka sorong kaliber, mikro pipet digital 2 – 20 µl, 20 – 200 µl dan 100 – 1000 µl, botol duran, jarum ose, pembakar spirtus, eppendorf, perforator no.3 (diameter 6 mm), laminar air flow, hot plate dan spatula logam.

2. Bahan

a. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah daun lampes yang diperoleh dari daerah Klaten.

b. Bahan Kimia

Aquades, Na₂SO₄ Anhidrous (Merck), DMSO p.a (Merck).

c. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Escherichia coli* FNCC 0091 yang diperoleh dari PAU UGM.

d. Media Bakteri

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah nutrisi agar p.a (Merck).

e. Zat pembanding Antibakteri

Zat pembanding yang digunakan adalah ampicilin.

D. Prosedur Penelitian

1. Identifikasi dan determinasi bahan awal

Dilakukan identifikasi dan determinasi tanaman yang akan digunakan berdasarkan ciri fisiologis tanaman seperti daun, bunga, batang serta akar.

2. Persiapan sampel lampes

Daun lampes dibersihkan, dicuci, kemudian dikeringkan pada suhu kamar atau diangin-anginkan ± 2 – 3 hari.

3. Isolasi Minyak Atsiri

Sebanyak 25 gram simplisia lampes didestilasi stahl dengan ± 750 ml aquades, selama kurang lebih 4 jam, selanjutnya minyak atsiri dipisahkan. Minyak atsiri yang masih bercampur dengan sedikit air dihilangkan dengan menambahkan Na₂SO₄ anhidrous sampai jenuh kemudian dipisahkan. Minyak atsiri yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk proses selanjutnya.

4. Identifikasi komponen kimia minyak atsiri daun lampes

Uji GC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi komponen minyak atsiri dan sampel daun lampes. Kondisi alat GC- MS sebagai berikut :

Jenis Pengion	: EI (Electron Impact).
Jenis kolom	: Rtx-5MS.
Panjang kolom	: 30 meter.
Diameter kolom	: 0,25 mm.
Suhu kolom	: 80 °C.
Suhu injektor	: 280 °C.

5. Uji antibakteri minyak atsiri

a. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan untuk aktivitas antibakteri disterilkan dalam autoklaf dengan temperatur 121°C selama \pm 15 menit.

b. Pembuatan media agar miring

Nutrien Agar (NA) ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam 50 ml aquades, dipanaskan diatas hot plate dengan stirer sampai warna kuning bening. Larutan agar kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing – masing sebanyak 5 ml. Tabung reaksi ditutup dengan kapas dan alumunium foil. Tabung reaksi dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit, kemudian diletakkan di tempat yang miring dan didiamkan sampai padat pada suhu kamar.

c. Uji antibakteri minyak atsiri

Nutrien agar sebanyak 1 gram dilarutkan dalam aquades 50 ml., dipanaskan sampai kuning bening, kemudian dimasukkan ke dalam botol duran masing – masing sebanyak 15 ml. Menyiapkan aquades steril untuk membuat bakteri dalam bentuk suspensi dengan memasukkan 3 ml aquades ke dalam tabung reaksi dan ditutup rapat dengan kapas, dengan catatan 1 tabung untuk 1 bakteri

Pada pembuatan suspensi bakteri dengan cara mengambil 1 ose bakteri kemudian dimasukkan dalam aquades steril dan aduk, sampai larutan keruh

selanjutnya mengambil 100 µl suspensi bakteri lalu ditaruh dalam cawan petri yang steril. Cawan petri yang berisi suspensi bakteri, kemudian dituangkan media NA steril, selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan dengan gerakan memutar dan didiamkan sampai beku (± 15 menit). Setelah itu, dibuat sumuran dengan ukuran 6 mm dengan alat pavorator dan spatula. Diisikan sumuran tersebut dengan 20 µl sampel atau bahan yang diujikan dan dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

d. Penetapan KHM minyak atsiri

Minyak atsiri yang menunjukkan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri kemudian dibuat dengan variasi konsentrasi secara menurun dengan pelarut DMSO yang selanjutnya dilakukan uji antibakteri masing – masing konsentrasi untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

e. Penetapan KHM ampisilin dan nilai banding

Penetapan KHM ampisilin seperti penetapan KHM minyak atsiri, selanjutnya dengan membuat kurva standar ampisilin, yaitu antara konsentrasi (ppm) terhadap Daerah Diameter Hambat (DDH, mm). Kurva ini digunakan sebagai pembanding bagi sampel yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan cara menarik garis lurus yang memotong kurva baku dan diameter hasil pengamatan sehingga diperoleh konsentrasi sampel dari kurva. Nilai banding sampel terhadap ampisilin dapat dihitung seperti pada persamaan 5 :

$$\text{Nilai banding} = \frac{\text{Konsentrasi sampel dari kurva}}{\text{Konsentrasi sampel sebenarnya}} \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

f. Pengamatan hasil

Pengamatan penghambatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengukur diameter zona bening disekitar sumuran yang merupakan diameter zona penghambatan sampel.

E. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Isolasi minyak atsiri menggunakan metode destilasi stahl, sehingga akan diperoleh kadar minyak atsiri dengan perhitungan seperti pada persamaan 6.

$$\text{Kadar minyak atsiri} = \frac{\text{Volume minyak atsiri daun lampes}}{\text{Berat simplisia daun lampes}} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

Pada kromatogram GC dihasilkan informasi jumlah senyawa dan dari spektra GC-MS didapatkan struktur senyawa yang terdeteksi dalam minyak atsiri daun lampes kemudian dibandingkan dengan data sekunder dari literatur.

Uji antibakteri dengan metode difusi akan didapat nilai diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri dan kemudian dibandingkan dengan zona hambat antibiotik sintesis. Adanya hambatan yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan, maka dilanjutkan dengan menentukan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dengan cara memvariasi konsentrasi minyak atsiri.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi bahan awal

Identifikasi sampel tanaman di bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah benar *Ocimum sanctum* L. atau lampes (hasil pada Lampiran 1).

B. Persiapan sampel

Daun lampes dipisahkan dari tangkainya kemudian dilakukan pengeringan dengan cara diangin – anginkan dalam ruang terbuka (suhu kamar) tidak boleh terkena sinar matahari langsung selama $\pm 2 - 3$ hari. Hal ini dilakukan untuk mengurangi kadar air.

Proses pengeringan dan penyimpanan mempengaruhi kehilangan minyak atsiri. Sebagian minyak atsiri dalam bahan akan menguap selama pengeringan udara. Kehilangan minyak atsiri selama proses pengeringan lebih besar dibanding pada saat penyimpanan, karena pada saat pengeringan tumbuhan masih mengandung sebagian besar air dalam sel dan dengan proses difusi akan membawa minyak ke permukaan, kemudian menguap. Apabila bahan harus disimpan sebelum destilasi maka penyimpanan dilakukan pada udara kering yang bersuhu rendah dan udara tidak disirkulasikan sehingga dapat mengurangi penguapan minyak dari bahan (Ketaren, 1987).

C. Isolasi minyak atsiri

Minyak atsiri yang diperoleh dari hasil destilasi stahl berupa cairan berwarna putih kekuningan dan berbau khas lampes dengan kadar 0,41% (v/b) (perhitungan pada Lampiran 2). Kandungan minyak atsiri dalam suatu bahan tergantung dari umur tanaman dan kandungan mineral tempat hidupnya. Selain itu, juga karena adanya faktor fisika dan faktor kimia yang mempengaruhi kehilangan minyak atsiri. Faktor fisika disebabkan oleh proses pengeringan dan penyimpanan.

Faktor kimia disebabkan oleh komponen minyak atsiri yang sebagian terdiri dari senyawa yang mengandung heteroatom oksigen seperti alkohol, aldehyd dan oksigen. Adanya heteroatom menyebabkan senyawa – senyawa tersebut mudah terurai (Augusta, 2000). Rendemen minyak atsiri yang dihasilkan dari daun lampes tergantung dari beberapa faktor diantaranya iklim, kesuburan tanah, umur tanaman dan cara penyulingan (Anonim, 1970).

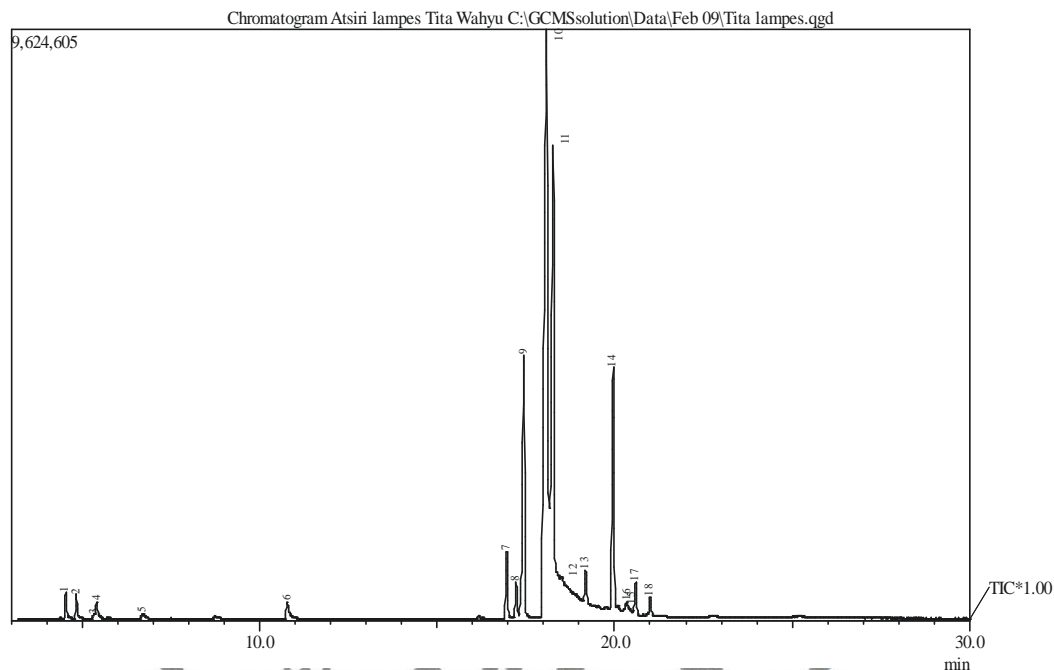
Destilasi adalah proses pemisahan komponen yang berupa cairan atau padatan dari dua macam campuran atau lebih berdasarkan perbedaan titik uapnya dan proses ini dilakukan terhadap minyak atsiri yang tidak larut dalam air. Isolasi dilakukan dengan destilasi stahl. Prinsip kerja destilasi stahl sama dengan destilasi dengan air (hidrodestilasi). Namun destilasi stahl memiliki beberapa kelebihan. Kelebihan penggunaan destilasi stahl antara lain :

1. Minyak atsiri yang dihasilkan tidak berhubungan langsung dengan udara luar sehingga tidak mudah menguap.
2. Volume minyak atsiri yang dihasilkan dapat langsung diketahui jumlahnya karena alatnya dilengkapi dengan skala.

Pengambilan minyak atsiri dengan destilasi dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu besarnya tekanan uap yang digunakan, bobot molekul masing – masing komponen dalam minyak dan kecepatan keluarnya minyak atsiri dari simplisia (Satyadiwira, 1979). Pengaruh yang penting selama penyulingan berlangsung adalah suhu terhadap minyak atsiri. Pada dasarnya semua senyawa penyusun minyak atsiri tidak stabil atau peka terhadap suhu tinggi. Itulah sebabnya untuk memperoleh kualitas minyak atsiri diupayakan pada suhu pemanasan yang rendah. Namun, bila suhu pemanasan tinggi maka panas penyulingan diusahakan dalam waktu sesingkat mungkin (Sastrohamidjojo, 2004).

D. Identifikasi komponen kimia minyak atsiri daun lampes

Hasil kromatogram dari data GC-MS pada minyak atsiri daun lampes menunjukkan terdapat 18 komponen (18 puncak) yang terdeteksi. Kromatogram GC – MS ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 13. Kromatogram minyak atsiri daun lampes

Analisis kandungan minyak atsiri daun lampes pada penelitian ini dilakukan dengan analisis spektra massa yang didasarkan pada “*base peak*” dan SI (*Similarity Index*) dengan perbandingan spektra dari library, sehingga didapatkan 13 senyawa yang terdeteksi. Spektra massa GC-MS dari 13 komponen yang dianalisis ditunjukkan pada Tabel 2.

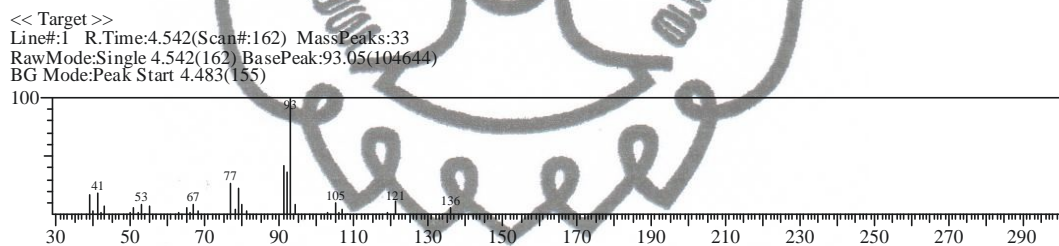
Tabel 2. Data spektra massa 13 komponen minyak atsiri daun lampes.

No	Waktu retensi (menit)	Puncak (% area)	SI	Berat Molekul	Perkiraan senyawa
1	4,542	1 (0,72)	97	136	α -pinen
2	4,842	2 (0,73)	97	136	kamfen
3	5,325	3 (0,12)	95	136	sabinen
4	5,408	4 (0,54)	97	136	β -pinen
5	10,783	6 (0,76)	97	139	endo-borneol
6	16,958	7 (2,55)	94	204	α -kopaen
7	17,442	9 (11,55)	97	189	β -elemen
8	18,092	10 (41,90)	94	178	metil-eugenol
9	18,267	11 (25,66)	95	204	trans-kariofilen
10	19,183	13 (1,24)	97	204	α -humulen
11	19,958	14 (9,95)	94	204	germakren-D
12	20,592	17 (1,19)	95	204	germakren-A
13	21,000	18 (0,65)	94	204	δ -kadinen

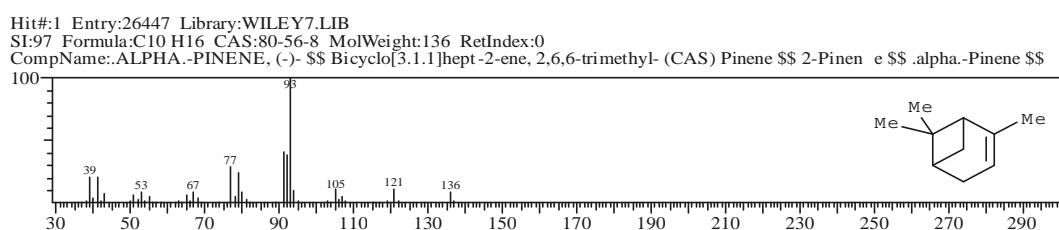
Minyak atsiri sebagian besar mengandung senyawa terpenoid. Secara kimia, minyak atsiri terdiri golongan monoterpen dan seskuiterpen (Padmawinata, 1987) serta golongan fenil propanoid (Augusta, 2000). Golongan monoterpen terdiri dari 5 senyawa, yaitu : α -pinen, β -pinen, kamfen, sabinen dan endo-borneol. Golongan seskuiterpen terdiri dari 7 senyawa, yaitu : α -kopaena, β -elemen ,trans-kariofilen, α -humulen, germakren-A, germakren-D dan δ -kadinen, sedangkan golongan fenil propenoid terdiri dari metil-eugenol. Berikut ini contoh analisis spektra massa senyawa pada minyak atsiri daun lampes :

1. Senyawa α -kopaena

Senyawa pada puncak 1 dengan waktu retensi 4,542 menit dan SI = 97 memiliki fragmen yang mirip dengan senyawa α -kopaena dengan rumus molekul $C_{15}H_{24}$ dan m/z 204. Spektra massa senyawa 1 dapat dilihat pada Gambar 14a dan spektra massa senyawa α -kopaena dapat dilihat pada Gambar 14b.



(a)



(b)

Gambar 14. (a). Spektra massa senyawa 1, (b). Spektra massa α -kopaena

Fragmentasi spektra massa senyawa 1 dan α -kopaena ditunjukkan pada Tabel 3. Pola fragmentasi dari senyawa I hasil analisis data GC-MS mirip dengan senyawa α -kopaena yang mempunyai SI = 97 (SI > 90), sehingga senyawa 1 dimungkinkan adalah senyawa α -kopaena yang merupakan golongan senyawa monoterpen.

Tabel 3. Fragmentasi senyawa 1 dibandingkan dengan fragmentasi senyawa α -kopaena (WILEY7. LIB) dengan SI = 97.

Senyawa	Puncak Fragmentasi							
Senyawa 1	41	53	67	77	93*	105	121	136
α -kopaena	39	53	67	77	93*	105	121	136

Ket : * = puncak dasar spektra massa

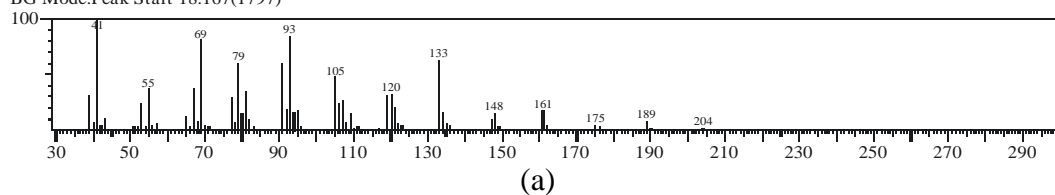
Spektra massa senyawa 1 menunjukkan pola fragmentasi yang didominasi oleh lepasnya CH_4 dari fragmen sebelumnya. Puncak dasar (*base peak*) terdapat pada m/z 93. Puncak berikutnya adalah m/z 121 (136-15) menandakan lepasnya CH_3 dari molekul. Puncak pada m/z 105 (121-16) menandakan lepasnya CH_4 . Puncak pada m/z 93 diperoleh dari lepasnya CH_4 dari m/z 77. Selanjutnya pola fragmentasi $-\text{C}-\text{C}$ menghasilkan fragmen pada m/z 67, 53 dan 41.

2. Senyawa trans-kariofilen

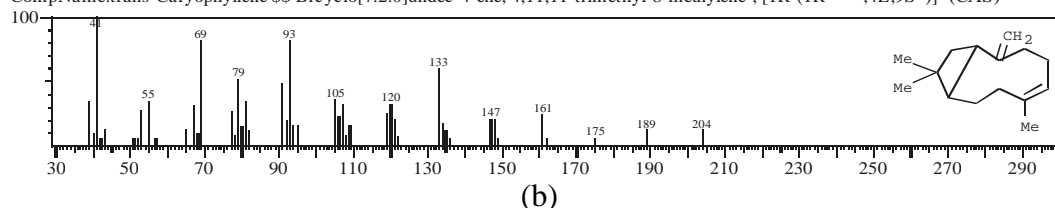
Senyawa pada puncak 11 dengan waktu retensi 18,269 menit dan SI = 95 memiliki fragmen yang mirip dengan senyawa trans-kariofilen dengan rumus molekul $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ dan m/z 178. Spektra massa senyawa 11 dapat dilihat pada Gambar 15a dan spektra massa senyawa trans-kariofilen dapat dilihat pada Gambar 15b.

<< Target >>

Line#:11 R.Time:18.267(Scan#:1809) MassPeaks:61
RawMode:Single 18.267(1809) BasePeak:41.05(526068)
BG Mode:Peak Start 18.167(1797)



Hit#:1 Entry:100774 Library:WILEY7.LIB
SI:95 Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ CAS:87-44-5 MolWeight:204 RetIndex:0
CompName:trans-Caryophyllene $\text{Bicyclo}[7.2.0]\text{undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-}$, [1R-(1R*, 4E,9S*)]- (CAS)



Gambar 15. (a). Spektra massa senyawa 11, (b). Spektra massa trans-kariofilen

Spektra massa senyawa senyawa 11 dan trans-kariofilen mempunyai perbandingan m/z yang dapat diamati pada Tabel 4. Senyawa 11 dari analisis data GC-MS menunjukkan pola fragmentasi dan $SI = 95$ ($SI > 90$) mirip dengan senyawa trans-kariofilen, sehingga senyawa 11 dimungkinkan adalah senyawa trans-kariofilen yang merupakan golongan senyawa seskuiterpen.

Tabel 4. Fragmentasi senyawa 11 dibandingkan dengan fragmentasi senyawa trans-kariofilen (WILEY7. LIB) dengan $SI = 95$

Senyawa	Puncak Fragmentasi												
Senyawa 11	41*	55	69	79	93	105	120	133	148	161	175	189	204
trans-kariofilen	41*	55	69	79	93	105	120	133	147	161	175	189	204

Ket : * = puncak dasar spektra massa

Pola fragmentasi spektra massa senyawa 11 didominasi oleh lepasnya CH_2 dari fragmen sebelumnya, puncak dasar (*base peak*) terdapat pada m/z 41. Puncak berikutnya adalah m/z 189 (204-15) menandakan lepasnya CH_3 dari molekul. Puncak pada m/z 175 (189-14) menandakan lepasnya CH_2 . Selanjutnya pola fragmentasi $-\text{C}-\text{C}$ menghasilkan fragmen pada m/z 175, 161, 148, 133, 120, 105, 93, 79, 69, 55 dan 41.

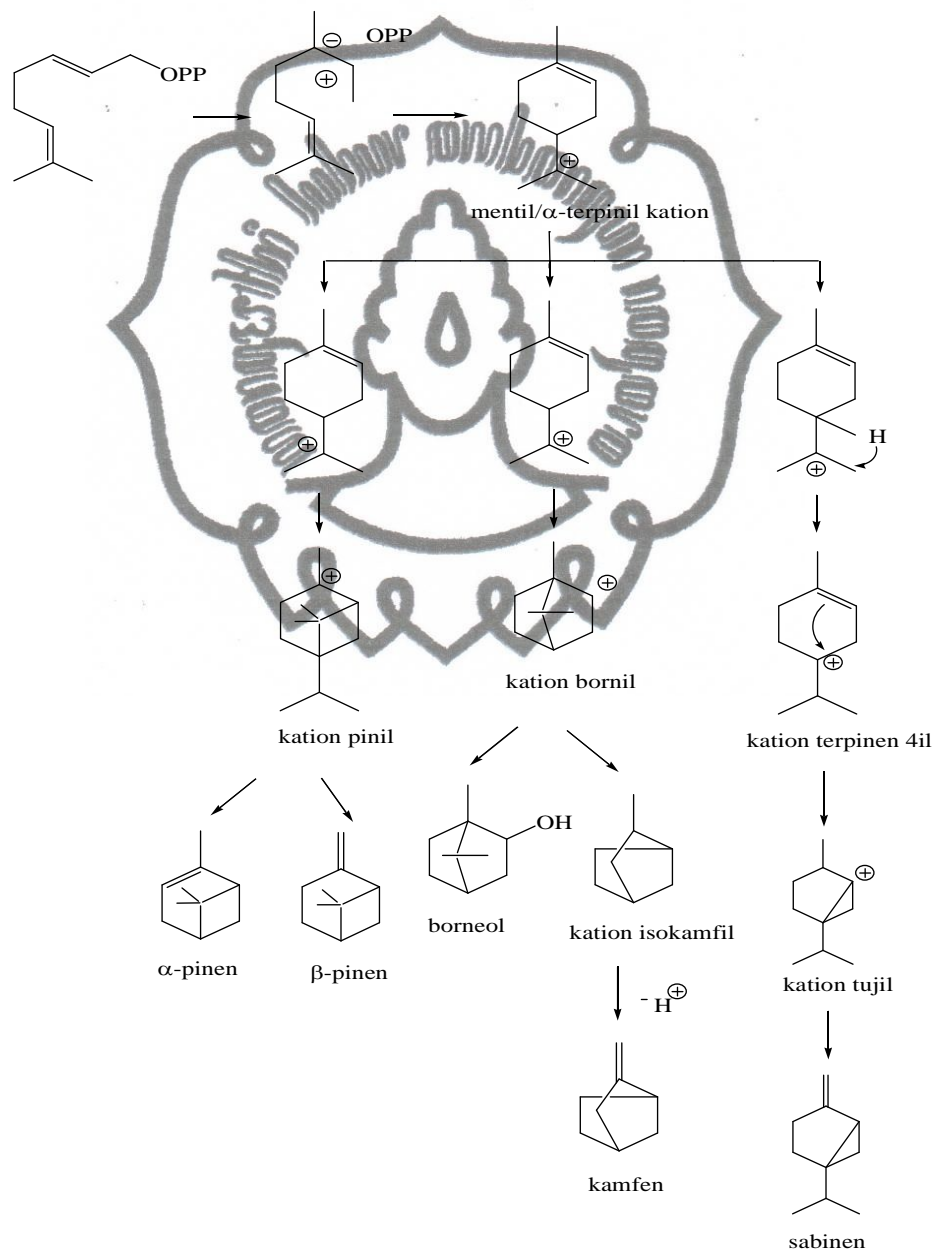
Analisis spektra massa GC-MS untuk 11 senyawa lainnya dilakukan dengan cara yang sama seperti analisis 2 senyawa yang telah dilakukan sebelumnya.

E. Biosintesis senyawa minyak atsiri daun lampes

1. Biosintesis lima senyawa golongan monoterpen

Biosintesis senyawa monoterpen pada minyak atsiri daun lampes ditunjukkan pada Gambar 16. Kation α -terpinil mengalami siklikasi menghasilkan kation pinil, kation bornil dan kation terpinen-4-il. Senyawa α -pinen dan β -pinen yang merupakan suatu enansiomer berasal dari arah proton yang sama dari α -terpinil menghasilkan ikatan rangkap sebagai siklik. Senyawa borneol merupakan hasil dari kation bornil dengan air dan mengalami suatu oksidasi menghasilkan

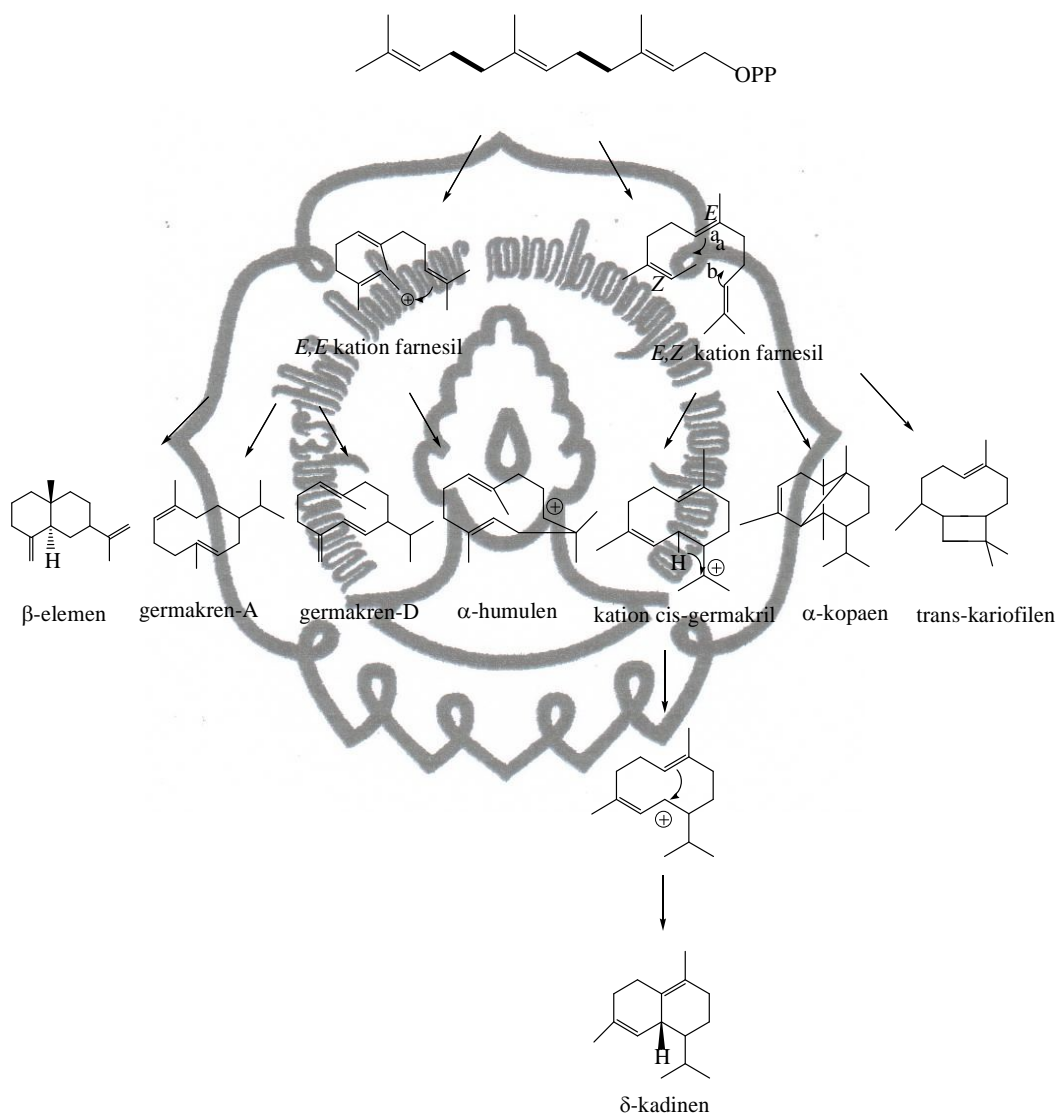
kamfor, alur ini merupakan reaksi oksidasi dari alkohol menjadi keton. Kation bornil mengalami penataulangan Wagner-Meerwein sehingga menghasilkan kamfen. Kamfen (3,3-dimetil-2-metilen-norkamfana) termasuk golongan monoterpen bisiklik yang menguap pada temperatur ruang dan berbau tajam atau pedas. Sabinen berasal dari kerangka tujan yang merupakan hasil reaksi siklikasi kation 4-il (Dewick, 2002).



Gambar 16. Biosintesis senyawa monoterpen
(Dewick, 2002)

2. Biosintesis tujuh senyawa golongan seskuiterpen

Biosintesis senyawa seskuiterpen minyak atsiri daun lampes ditunjukkan pada Gambar 17. Enzim farnesil pirofosfat merupakan senyawa antara kunci dalam biosintesis terpenoid yang dihasilkan dari geranyl pirofosfat (Herbert, 1981).



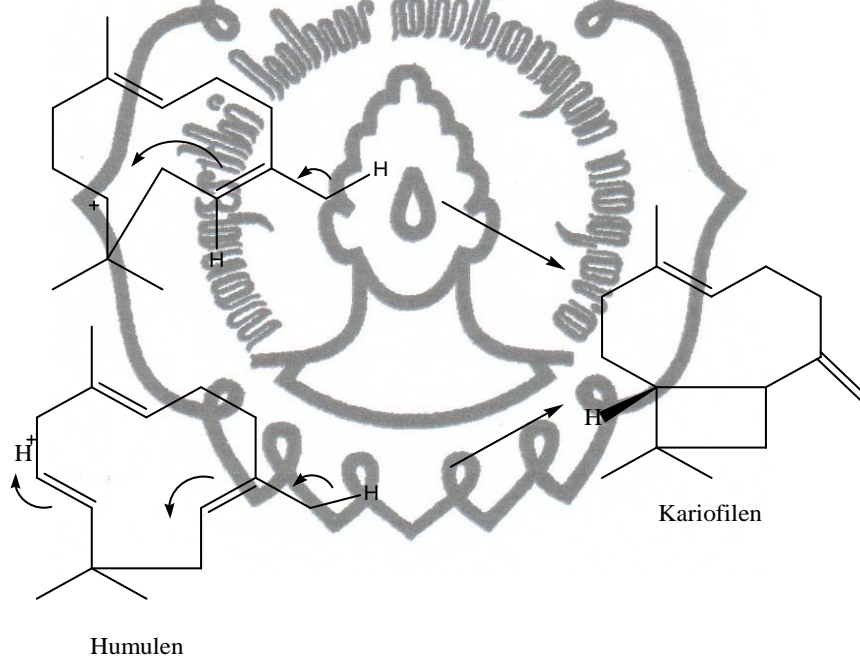
Gambar 17. Biosintesis senyawa seskuiterpen

Farnesil pirofosfat dibedakan menjadi dua yaitu kerangka trans-farnesil pirofosfat (β -elemen, germakren, α -humulen) dan cis-farnesil pirofosfat (δ -kadinen, α -kopaen, kariofilen). Stabilisasi dari karbokation melalui kehilangan proton pada atom karbon yang bersebelahan atau penyerangan oleh ion hidroksida.

commit to user

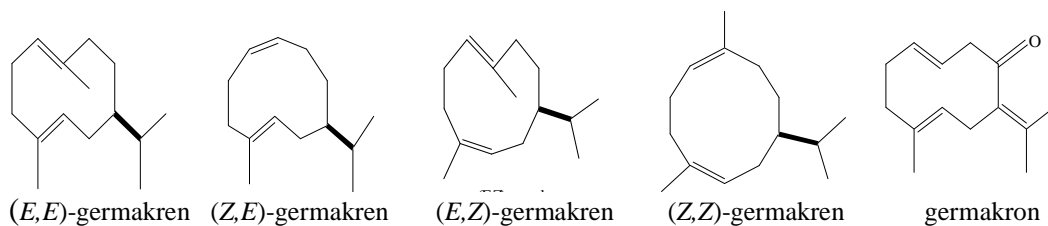
Kation dari kerangka primer dapat menjadi senyawa seskuiterpen golongan lain (kerangka seskuiterpen sekunder).

Ada suatu hubungan genetik antara humulen dan kariofilen, kedua hidrokarbon tersebut sering terdapat bersama – sama dalam minyak atsiri. Dengan hubungan stereokimia, senyawa humulen dengan ikatan rangkap yang mempunyai konfigurasi -E berasal dari trans-farnesil pirofosfat, sedangkan kariofilen berasal dari cis-farnesil pirofosfat (Manitto, 1981). Senyawa kariofilen juga bisa berasal dari humulen, seperti dicantumkan pada Gambar 18.



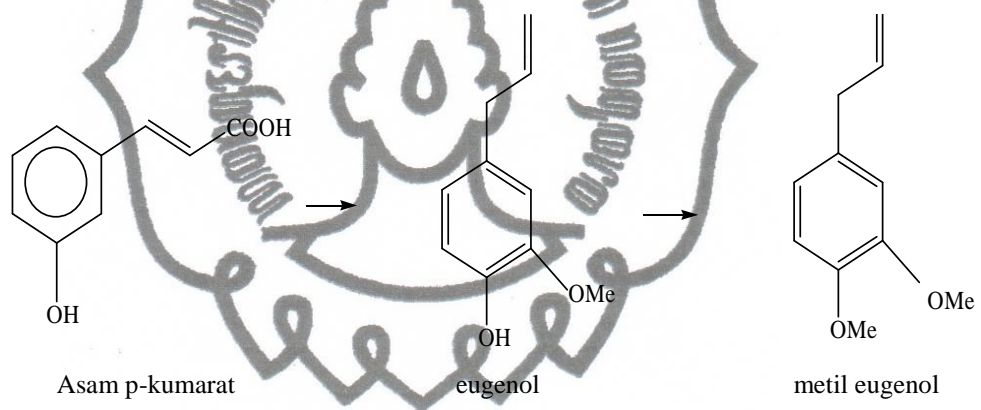
Gambar 18. Biosintesis dari senyawa kariofilen (Manitto, 2000)

Senyawa seskuiterpen dari golongan germakren dibentuk dari kation. Adanya ikatan rangkap pada konfigurasi -E menunjukkan bahwa senyawa germakren berasal dari trans-farnesil pirofosfat. Pada Gambar 19 menunjukkan ikatan rangkap dalam posisi dan konfigurasi -E sehingga memungkinkan terjadi siklikasi elektrofilik intramolekular untuk membentuk produk bisiklis (Manitto, 1981), seperti (E,E)-germakren, (Z,E)-germakren (Melampolide), (E,Z)-germakren, (Z,Z)-germakren (heliangolides), germakron.



Gambar 19. Modifikasi dari senyawa germakren
(Herbert, 1981)

Senyawa golongan monoterpen dan seskuiterpen merupakan senyawa yang berasal dari jalur biosintesis asam mevalonat, sedangkan senyawa yang melalui jalur biosintesis asam sikimat adalah metil-eugenol, yang ditunjukkan pada Gambar 20.



Gambar 20. Jalur biosintesis senyawa metil eugenol
(Gang, 2002)

Metil eugenol mempunyai aroma yang khas maka senyawa tersebut merupakan senyawa *sex attractant* bagi lalat buah (Suklo and Prasad, 1985). Senyawa ini banyak digunakan untuk antijamur (Karapinar and Aktug, 1987), pembuatan parfum, sabun (Guenther, 1949).

F. Uji Antibakteri

1. Uji aktivitas antibakteri Minyak Atsiri Daun lampes

Pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri daun lampes dilakukan pada konsentrasi $1,05 \cdot 10^6$ ppm; $7,875 \cdot 10^5$ ppm; $5,25 \cdot 10^5$ ppm dan $2,625 \cdot 10^5$. Minyak atsiri dengan konsentrasi tersebut diuji aktivitas antibakterinya terhadap

Staphylococcus aureus dan *Eschericia coli* dengan metode difusi agar yaitu menggunakan metode cara sumuran.

Metode difusi dipilih karena pada metode ini ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri dapat teramati dengan jelas, sehingga dapat memudahkan dalam pengamatan terhadap bakteri uji. Pada metode ini zat yang akan ditentukan aktivitas antibakterinya berdifusi pada lempeng agar yang telah ditanami bakteri yang diuji. Dasar pengamatannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan disekeliling cakram atau silinder yang berisi zat antibakterinya. Setiap kuman dicampur ke dalam media, lalu ditanami antibakteri dan diinkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 37 °C, setelah masa inkubasi selesai diamati diameter hambat dari antibakteri yang diuji.

Larutan DMSO (Dimetil Sulfoksida) digunakan sebagai kontrol negatif dan pelarut sampel karena larutan DMSO tidak mempunyai efek antibakteri sehingga tidak mempengaruhi hasil uji antibakteri. Penelitian uji aktivitas antibakteri pada daun Kemangi (*Ocimum basillicum* L.) oleh Magdalena (2008) menggunakan DMSO sebagai kontrol negatif dan pelarut sampel. Aktivitas minyak atsiri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Data aktivitas minyak atsiri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

Konsentrasi minyak atsiri (ppm)	Rata – rata DDH	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
1,05.10 ⁶	11,50 ± 0,31	11,96 ± 0,48
7,875.10 ⁵	10,86 ± 0,43	10,68 ± 0,03
5,25.10 ⁵	10,25 ± 0,07	10,30 ± 0,01
2,625.10 ⁵	9,49 ± 0,31	9,22 ± 0,05

Keterangan : Hasil 3x pengujian
Diameter lubang = 6mm
DDH = Diameter Daerah Hambat (mm)

Berdasarkan uji statistik One-Way ANOVA (Lampiran 8) dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang sama antara bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* terhadap antibakteri minyak atsiri daun lampes

(sig>0,05). Pada hasil pengujian, bakteri *Eschericia coli* menunjukkan DDH (Diameter Daerah Hambat) yang lebih besar dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus*. Hal ini berkaitan dengan permeabilitas dinding sel bakteri yang dipengaruhi oleh tebal tipisnya lapisan peptidoglikan dalam dinding sel.

Bakteri *Eschericia coli* mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis, terdiri dari 1 – 2 lapisan dan susunan dinding selnya tidak kompak sehingga memiliki permeabilitas yang cukup tinggi. Bakteri *Staphylococcus aureus* mempunyai susunan dinding sel yang kompak dengan lapisan peptidoglikan sebanyak 30 lapis sehingga permeabilitasnya rendah. Dengan permeabilitas yang rendah maka zat aktif dari minyak atsiri akan mengalami kesulitan untuk menembus membran sel bakteri gram positif sehingga efek bakterinya kurang optimal. Dengan terganggunya sintesis peptidoglikan maka pembentukan dinding sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan sehingga sel hanya dilapisi oleh membran sel. Keadaan ini menyebabkan sel bakteri mudah mengalami lisis karena tekanan osmotik yang menyebabkan sel bakteri mati.

Hasil analisa ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada masing-masing bakteri menunjukkan adanya penghambatan terhadap bakteri uji, analisa lebih lanjut dengan LSD dilakukan untuk mengetahui pengaruh antar konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil analisa LSD menunjukkan bahwa variasi konsentrasi $1,05.10^6$ ppm menunjukkan pengaruh yang berbeda. Pada *Staphylococcus aureus* variasi konsentrasi $1,05.10^6$ ppm menunjukkan pengaruh yang berbeda hanya pada konsentrasi $5,25.10^5$ ppm dan $2,625.10^5$ ppm sedangkan pada *Eschericia coli* variasi konsentrasi $1,05.10^6$ ppm menunjukkan pengaruh yang berbeda pada konsentrasi $7,875.10^5$ ppm, $5,25.10^5$ ppm dan $2,625.10^5$ ppm. Hasil analisa ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada bakteri dapat dilihat pada Lampiran 9.

2. Penetapan KHM Minyak Atsiri Daun lampes

Pada uji difusi dapat menghambat pertumbuhan bakteri, kemudian dilakukan uji lanjut dengan memvariasi konsentrasi minyak atsiri untuk mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimal). Dalam penentuan KHM

dilakukan penurunan konsentrasi sampai tidak terjadi penghambatan dari antibakteri. Pada penelitian ini variasi konsentrasi dilakukan sampai pada konsentrasi 1050 ppm; 787,5 ppm; 525,5 ppm dan 262,25 ppm. Aktivitas KHM minyak atsiri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Data aktivitas KHM minyak atsiri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

Konsentrasi minyak atsiri (ppm)	Rata – rata DDH	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
1050	6,97 ± 0,15	7,63 ± 0,19
787,5	6,39 ± 0,10	6,82 ± 0,28
525,5	6,00 ± 0,00	6,38 ± 0,26
262,25	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00

Keterangan : Hasil 3x pengujian
Diameter lubang = 6mm
DDH = Diameter Daerah Hambat (mm)

Berdasarkan uji statistik One-Way ANOVA (Lampiran 11) dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang sama antara bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* terhadap antibakteri minyak atsiri daun lampes (sig>0,05). Dari data uji aktivitas antibakteri diatas, nilai kadar hambat minimal minyak atsiri daun lampes terhadap *Eschericia coli* adalah 525,5 ppm sedangkan nilai kadar hambat minimal terhadap *Staphylococcus aureus* adalah 787,5 ppm.

Hasil analisa ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada masing –masing bakteri menunjukkan adanya penghambatan terhadap bakteri uji. Hasil analisa LSD menunjukkan bahwa variasi konsentrasi menunjukkan pengaruh yang berbeda. Pada *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* variasi konsentrasi 1050 ppm menunjukkan pengaruh yang berbeda pada konsentrasi 787,5 ppm; 525,5 ppm dan 262,25 ppm. Hasil analisa ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada bakteri dapat dilihat pada Lampiran 12.

3. Penetapan KHM Ampisilin dan Nilai Banding

Antibiotik sintesis yang digunakan pada penelitian aktivitas antibakteri minyak atsiri dan lampes adalah ampisilin. Ampisilin merupakan antibiotik yang berspektrum luas yang aktif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Ampisilin mengandung cincin β laktam, merupakan senyawa pengasilasi kuat dan mempunyai kespesifikan tinggi terhadap gugus amino serin dari enzim transpeptidase, suatu enzim yang mengkatalisis tahap akhir sintesis dinding sel bakteri (Siswandono dan Soekarjo, 2000). Pengujian aktivitas antibakteri terhadap ampisilin dilakukan dengan berbagai konsentrasi dari 10 ppm sampai 0,25 ppm. Hasil pengujian aktivitas KHM ampisilin ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Data aktivitas KHM ampisilin terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

Konsentrasi ampisilin (ppm)	Rata – rata DDH	
	<i>Staphylococcus. aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
10	10,62 \pm 0,26	10,26 \pm 0,26
7,5	9,20 \pm 0,77	9,52 \pm 0,11
5	8,31 \pm 0,52	8,66 \pm 0,89
2,5	7,06 \pm 0,22	7,09 \pm 0,52
1	6,83 \pm 0,19	7,05 \pm 0,36
0,75	6,50 \pm 0,33	6,74 \pm 0,45
0,5	6,03 \pm 0,04	6,43 \pm 0,29
0, 25	6,00 \pm 0,00	6,00 \pm 0,00

Keterangan : Hasil 3x pengujian
Diameter lubang = 6mm
DDH = Diameter Daerah Hambat (mm)

Berdasarkan uji statistik One-Way ANOVA (Lampiran 14) dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang tidak berbeda antara bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* terhadap ampisilin ($\text{sig} > 0,05$). Pada data uji aktivitas antibakteri diatas, nilai kadar hambat minimal ampisilin terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* adalah 0,5 ppm. Pada ampisilin konsentrasi 0,5 ppm nilai Diameter Daerah Hambat *Staphylococcus. aureus* (6,03 \pm 0,04 mm) lebih kecil dibandingkan *Eschericia coli* (6,43 \pm 0,29 mm) karena ampisilin merupakan suatu senyawa yang polar sehingga akan cenderung lebih

berinteraksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* yang memiliki kandungan lipid rendah.

Analisa dengan LSD dilakukan untuk mengetahui pengaruh antar konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil analisa LSD menunjukkan bahwa pada *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan variasi konsentrasi menunjukkan pengaruh yang berbeda pada semua konsentrasi ($\text{sig} < 0,05$). Hasil analisa ANOVA pengaruh variasi konsentrasi pada bakteri dapat dilihat pada Lampiran 15.

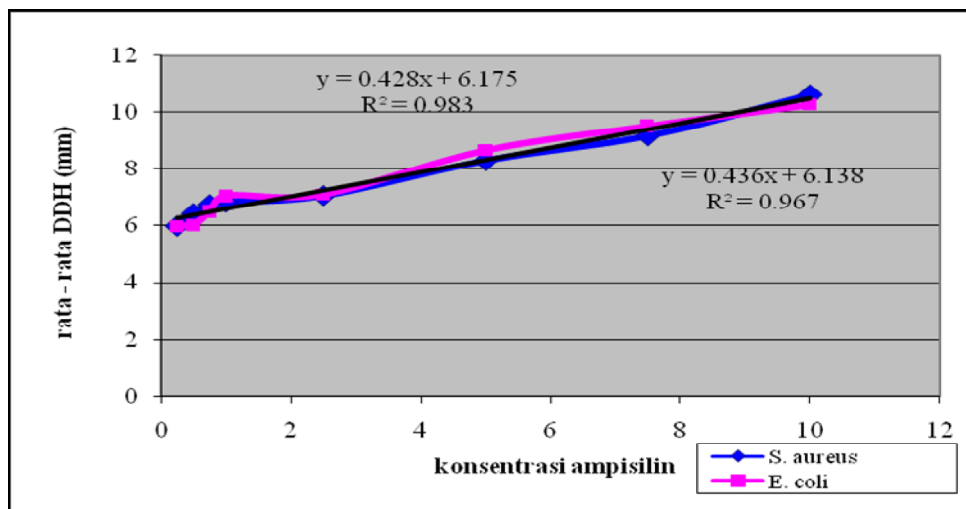
Penetapan nilai banding dilakukan bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri minyak atsiri sebagai antibiotik alami dibandingkan dengan ampisilin sebagai antibiotik buatan. Konsentrasi minyak atsiri yang digunakan adalah 1050 ppm yang merupakan konsentrasi tertinggi untuk penentuan KHM. Hasil pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri 1050 ppm digunakan untuk menetapkan nilai banding yang ditunjukkan pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri konsentrasi 1050 ppm terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

Konsentrasi (ppm)	Rata – rata DDH	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
1050	$6,78 \pm 0,15$	$7,65 \pm 0,16$

Keterangan : Hasil 3x pengujian
 Diameter lubang = 6mm
 DDH = Diameter Daerah Hambat (mm)

Pada penetapan nilai banding minyak atsiri dihitung menggunakan persamaan pada grafik ampisilin dengan membuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi (ppm) dengan rata – rata DDH (mm) untuk setiap bakteri uji. Pada grafik terdapat persamaan garis untuk masing – masing bakteri uji. Persamaan garis tersebut digunakan untuk menetapkan nilai banding minyak atsiri terhadap ampisilin yang ditunjukkan pada Gambar 21.



Gambar 21. Hubungan log konsentrasi ampisilin Vs Rata – rata DDH

Pada Gambar 19 diketahui bahwa pada konsentrasi 1050 ppm minyak atsiri memberikan diameter hambat rata – rata untuk bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 6,78 mm, kemudian dengan menggunakan persamaan garis linear dari grafik ampisilin maka didapat $x = 1,412$ sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri minyak atsiri konsentrasi 1050 ppm setara dengan 0,13% ampisilin. Selanjutnya, pada konsentrasi 1050 ppm minyak atsiri memberikan diameter hambat rata-rata untuk bakteri *Escherichia coli* adalah 7,65 mm, kemudian dengan menggunakan persamaan garis linear dari grafik ampisilin maka didapat $x = 3,463$ sehingga dapat disimpulkan aktivitas antibakteri minyak atsiri konsentrasi 1050 ppm setara dengan 0,33% ampisilin. Dari nilai banding ternyata minyak atsiri daun lampes sebagai antibakteri mempunyai potensi yang relatif kecil terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dibandingkan dengan antibiotik sintetis (ampisilin).

Minyak atsiri mengandung senyawa golongan terpenoid yang mempunyai peran sebagai anestetik, antibakteri, hepatoprotektor dan efek farmakologi lain (Augusta, 2000). Berdasarkan identifikasi komponen kimia minyak atsiri daun lampes terdapat senyawa yang aktif terhadap antibakteri, diantaranya adalah germakren-D, kariofilen, α -humulen (Vieria, 2009) dan metil eugenol (Miyao, 1975).

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Dari hasil dan pembahasan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Isolasi minyak atsiri daun lampes diperoleh kadar 0,41%.
2. Hasil identifikasi komponen kimia minyak atsiri daun lampes dengan analisis data GC-MS adalah senyawa α -pinen (2,55%), kamfen (0,73%), sabinen (0,12%), β -pinen (0,54%), endo-borneol (0,76%), α -kopaena (2,55%), β -elemen (11,55%), metil-eugenol (41,90%), trans-kariofilen (25,66%), α -humulen (1,24%), germakren-A (1,19%), germakren-D (9,95%) dan δ -kadinen (0,65%).
3. Minyak atsiri daun lampes mempunyai nilai KHM terhadap *Staphylococcus aureus* 787,5 ppm dan *Eschericia coli* 525,5 ppm, sedangkan nilai banding terhadap ampisilin yaitu 0,13% untuk *Staphylococcus aureus* dan 0,33% untuk *Eschericia coli*, sehingga dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri tersebut mempunyai potensi sebagai antibakteri relatif lebih kecil dibandingkan dengan antibiotik sintetik (ampisilin).

B. Saran

Perlu dilakukan uji lanjut untuk mengetahui senyawa aktif antibakteri dalam minyak atsiri daun lampes (*Ocimum sanctum* L.) dari senyawa – senyawa yang telah diisolasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1977. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Depkes RI, Jakarta.
- Anonim, 1970. *Specification Standard Essential Oil*. association of USA Inc.
- Anonim, 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jilid I. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.
- Anonim, 1993. *Dasar-Dasar Pemeriksaan Mikrobiologi*. UGM, Yogyakarta.
- Anonim, 1994. *Mikrobiologi kedokteran*. Edisi revisi. Staff Pengajar Fakultas Kedokteran. UI Binarupa Aksara, Jakarta.
- Black, J.G., 1999. *Microbiology Principles and Exploration*. Prentice Hall, New York.
- Breitmer, E., 2006. *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.kGaA, Germany.
- Cowan, M. M., 1999. *Plant Product as Antimicrobial Agents*. Departement of Microbiologi. Miami University.
- Dewick, M. P., 2002. *Medicinal Natural Product*. John Willey and Sons, England.
- Fauzia, R., 2007. *Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (Ocimum basilicum L.) Terhadap Staphylococcus aureus dan Eschericia coli*. Fakultas Farmasi. UMS, Surakarta.
- Fessenden, J. R dan Fessenden S. J., 1989. *Kimia Organik*. Jilid II. Erlangga, Jakarta.
- Gang, D. R., Wang, J., Dudareva, N., Narn, K.H., Simon, J., Lewinsohn, E., and Pichersky, E. 2001. *An Investigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil (Ocimum basilicum L.)*. Plant Physiol.
- Guenther, E., 1949. *The Essential Oils*. Princeton, NJ: D. Van Nostrand Co., Inc.
- Hendayana, S., 1994. *Kimia Analitik Instrumen*. Edisi 1. IKIP. Semarang Press, Surakarta.
- Herbert, R., 1981. *Biosintesis Metabolit Sekunder*. Chapman and Hall, New York.
- Howe, I and D. H Willians., 1981. *Mass Spectrometry Principles and Application*. 2nd edition, Mc Graw Hill. Inc, London.