



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN  
JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.)  
Swingle) TERHADAP *Porphyromonas gingivalis*  
ATCC 33277 SECARA *in vitro***

**SKRIPSI**

Oleh :  
**Amelia Kharismayanti**  
**NIM 111610101007**

**BAGIAN MIKROBIOLOGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN  
JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.)  
Swingle) TERHADAP *Porphyromonas gingivalis*  
ATCC 33277 SECARA *in vitro***

**SKRIPSI**

Oleh :  
**Amelia Kharismayanti**  
**NIM 111610101007**

**BAGIAN MIKROBIOLOGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN  
JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.)  
Swingle) TERHADAP *Porphyromonas gingivalis*  
ATCC 33277 SECARA *in vitro***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh:  
**Amelia Kharismayanti**  
**NIM 111610101007**

**BAGIAN MIKROBIOLOGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Rasulullah Muhammad SAW
3. Ibunda Susantin Fajariyah dan Ayahanda Imam Mudakir yang selalu mendoakan, membimbing dan memberi dukungan sehingga saya bisa menyelesaikan skripsi ini.
4. Adikku tercinta Bintang Kharismawan.
5. Guru-guru tercinta sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi.
6. Almamater tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

## MOTTO

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmu-lah hendaknya kamu berharap.  
(terjemahan Surat *Al- Insyirah* Ayat 5-8)<sup>\*)</sup>

Banyak kegagalan dalam hidup ini dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah.  
(Thomas Alfa Edison)<sup>\*\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al- Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

<sup>\*\*)</sup> J.F Tualaka. 2010. *Sepiring Motivasi untuk Sarapan Pagi*. Yogyakarta: Jogja Bangkit Publisher

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Amelia Kharismayanti

NIM : 111610101007

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) Terhadap *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 Secara *in vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, April 2015

Yang menyatakan,

Amelia Kharismayanti

NIM 111610101007

**SKRIPSI**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN  
JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.)  
Swingle) TERHADAP *Porphyromonas gingivalis*  
ATCC 33277 SECARA *in vitro***

Oleh:

**Amelia Kharismayanti**

**NIM 111610101007**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes, Sp.Perio

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Tantin Ermawati, M.Kes

**PENGESAHAN**

Skripsi ini berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (*Christm. & Panz.*) *Swingle*) Terhadap *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 Secara *in vitro*”, telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : Kamis, 23 April 2015

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua

Penguji Anggota

Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes

NIP 197102041998022002

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes

NIP 197608092005012002

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

drg. Melok Aris W, M.Kes, Sp.Perio

NIP 197104092005012002

drg. Tantin Ermawati, M.Kes

NIP 198003222008122003

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi,  
Universitas Jember,

Drg. Hj. Herniyati, M. Kes

NIP. 195909061985032001



## RINGKASAN

**Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) Terhadap *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 Secara *in vitro*:** Amelia Kharismayanti; 111610101007; 2015; 86 Halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyakit gigi dan mulut merupakan penyakit yang tersebar luas di masyarakat Indonesia. Periodontitis adalah suatu penyakit inflamasi yang merusak jaringan pendukung gigi yang akhirnya dapat menyebabkan kehilangan gigi. *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob Gram-negatif yang terlibat dalam patogenesis periodontitis. Infeksi yang disebabkan oleh *P. gingivalis* dapat diatasi dengan penggunaan antiseptik yaitu obat kumur *chlorexidine gluconate*. Namun *clorhexidine gluconate* apabila digunakan dalam jangka waktu panjang dapat menimbulkan beberapa efek samping sehingga perlu adanya penelitian lebih lanjut dalam rangka mencari bahan alternatif selain obat kumur *chlorexidine gluconate*.

Daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) merupakan tanaman obat yang mengandung minyak atsiri yang bersifat antibakteri, dimana senyawa aktif antibakteri yang terkandung di dalamnya adalah senyawa golongan terpena. Aktivitas kerja minyak atsiri dalam menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri yaitu dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel sehingga membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk secara tidak sempurna. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk nipis terhadap *P. gingivalis* dan mengetahui konsentrasi terkecil minyak atsiri daun jeruk nipis yang masih mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. gingivalis*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Minyak atsiri daun jeruk nipis diambil dengan destilasi uap air lalu diencerkan dengan larutan Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10% + Tween 80 0,5% secara *serial dilution* hingga menjadi

konsentrasi 100%, 50%, 25% dan 12,5%. Kontrol positif menggunakan *chlorexidine gluconate* 0,2%. Semua kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion methode*). Setiap sampel dari masing masing kelompok dimasukkan ke lubang sumuran pada media telah diinokulasi bakteri *P. gingivalis*. Setelah itu *petridish* dimasukkan desikator dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan 48 jam dalam inkubator. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat setiap 24 jam dan 48 jam dengan jangka sorong digital.

Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat di sekitar lubang sumuran. Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. gingivalis*, namun diameter zona hambatnya berkurang pada hari ke-2. Semakin besar konsentrasi minyak atsiri yang digunakan maka semakin besar pula diameter zona hambatnya. Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah minyak atsiri daun jeruk nipis mampu menghambat pertumbuhan *P. gingivalis* serta konsentrasi terkecil minyak atsiri daun jeruk nipis yang masih mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. gingivalis* adalah 12,5%

## PRAKATA

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) Terhadap *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 Secara *in vitro*”. Skripsi ini disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. drg. Hj. Herniyati, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes., Sp.Perio selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, ilmu, dan dukungan untuk menyelesaikan skripsi ini;
3. drg. Tantin Ermawati, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, ilmu, dan dukungan untuk menyelesaikan skripsi ini;
4. Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes, selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberikan masukan pemikiran dan saran yang membangun demi kesempurnaan skripsi ini;
5. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes, selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan masukan pemikiran dan saran yang membangun demi kesempurnaan skripsi ini;
6. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes atas pemberian bakteri *P. gingivalis* serta bantuan dan sarannya;
7. Dr. drg. Achmad Gunadi, M.S., Ph.d, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbing selama masa perkuliahan;

8. Kedua orang tuaku, Ibunda Susantin Fajariyah dan Ayahanda Imam Mudakir atas segala kasih sayang, doa, kesabaran, semangat, dan pengorbanan yang tiada habisnya selama ini.
9. Adikku Bintang Kharismawan atas dorongan dan semangatnya;
10. Keluarga besar di Jember dan Bangkalan atas doa dan wejangannya;
11. Seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi dan Laboratorium Rekayasa Proses dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember serta Bapak Darto yang telah membantu selama proses penelitian;
12. Sahabatku Novdianti Ayu Maharti dan Yuntari Daniyati;
13. Sahabat-sahabatku alumni SMA Negeri 2 Jember, Ina, Nisa, Ajeng, Dwi Setiawan, Tio, Jeje, Amalia, Putri, Ratih, Wildan;
14. Teman-teman KKN Desa Tegalwangi, Kecamatan Umbulsari kelompok 184 dan 95, Mas Arul, Ama, Ana, Tyo, Lia, Ari, Fani, Stevanus;
15. Teman-teman seperjuangan FKG UJ 2011 yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu;
16. Serta seluruh pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian skripsi ini.

Pada kesempatan ini, penulis juga ingin menyampaikan bahwa penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu, kritik serta saran yang bersifat membangun diharapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua..

Jember, April 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 <i>P.gingivalis</i></b> .....	5
2.1.1 Taksonomi <i>P.gingivalis</i> .....	5
2.1.2 Karakteristik <i>P.gingivalis</i> .....	6
2.1.3 Media Pertumbuhan <i>P.gingivalis</i> .....	7

2.1.4 Kolonisasi <i>P.gingivalis</i> .....	7
2.1.5 Fase Pertumbuhan <i>P.gingivalis</i> .....	8
<b>2.2 Antibakteri</b> .....	9
2.2.1 Mekanisme Kerja Antibakteri .....	10
<b>2.3 Jeruk Nipis</b> .....	12
2.3.1 Taksonomi Jeruk Nipis .....	12
2.3.2 Varietas Jeruk Nipis .....	13
2.3.3 Morfologi Jeruk Nipis .....	13
2.3.4 Lingkungan Tumbuh Jeruk Nipis .....	14
2.3.5 Manfaat Jeruk Nipis .....	15
<b>2.4 Minyak Atsiri</b> .....	15
2.4.1 Sifat-sifat Minyak Atsiri .....	16
2.4.2 Metode Isolasi Minyak Atsiri .....	16
<b>2.5 Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis Sebagai Antibakteri</b> .....	19
2.5.1 Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis .....	19
2.5.2 Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis .....	21
<b>2.6 Kerangka Konseptual</b> .....	23
<b>2.7 Hipotesis</b> .....	23
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	24
<b>3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian</b> .....	24
<b>3.2 Tempat Penelitian</b> .....	24
<b>3.3 Waktu Penelitian</b> .....	24
<b>3.4 Variabel Penelitian</b> .....	24
<b>3.5 Definisi Operasional</b> .....	25
<b>3.6 Sampel Penelitian</b> .....	26

<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	27
<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	28
3.8.1 Tahap Persiapan .....	28
3.8.2 Tahap Perlakuan .....	32
3.8.3 Tahap Pengukuran .....	33
3.8.4 Analisis Data .....	34
<b>3.9 Alur Penelitian</b> .....	35
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	36
<b>4.1 Hasil Penelitian</b> .....	36
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	41
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	46
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	46
<b>5.2 Saran</b> .....	46
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	47
<b>LAMPIRAN</b> .....	53

**DAFTAR TABEL**

	<b>Halaman</b>
2.1 Komposisi minyak atsiri daun jeruk nipis .....	20
4.1 Rerata diameter zona hambat minyak atsiri daun jeruk nipis terhadap <i>P.gingivalis</i> .....	37
4.2 Uji normalitas <i>Shapiro Wilk</i> .....	38
4.3 Uji homogenitas <i>Levene</i> .....	39
4.4 Uji <i>Kruskall Wallis</i> .....	39
4.5 Uji <i>Mann Whitney</i> hari ke-1 .....	40
4.6 Uji <i>Mann Whitney</i> hari ke-2 .....	40



DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
2.1 (a) Kolonisasi <i>P.gingivalis</i> pada media <i>blood agar</i> dan (b) mikrograf elektron <i>P.gingivalis</i> strain ATCC 33277 .....	6
2.2 Kurva pertumbuhan <i>P.gingivalis</i> .....	9
2.3 Tanaman jeruk nipis .....	14
2.4 Skema umum penyulingan minyak atsiri .....	18
2.5 Struktur kimia <i>limonene</i> dan <i>geranial</i> .....	21
2.5 Kerangka konseptual penelitian .....	23
3.1 Skema pembagian daerah pada <i>petridish</i> .....	33
3.2 Cara Pengukuran Diameter Zona Hambat .....	34
4.1 Zona hambat minyak atsiri daun jeruk nipis terhadap <i>P. gingivalis</i> .....	36
4.2 Histogram rerata diameter zona hambat hari ke-1 .....	38

DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
A. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri <i>P.gingivalis</i> .....	53
B. Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan Jeruk Nipis .....	55
C. Surat Keterangan Destilasi Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis .....	56
D. Hasil Penelitian dan Analisis Data Pada Hari ke-2 .....	58
E. Alat dan bahan Penelitian .....	60
F. Foto Hasil Penelitian .....	63
G. Pembuatan Kontrol Negatif .....	64
H. Data Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat .....	65
I. Analisis Data .....	66

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit gigi dan mulut merupakan penyakit yang tersebar luas di masyarakat Indonesia. Ada dua penyakit gigi dan mulut yang mempunyai prevalensi cukup tinggi di Indonesia yaitu karies dan penyakit periodontal yaitu periodontitis. Periodontitis adalah suatu penyakit inflamasi yang merusak jaringan pendukung gigi yang akhirnya dapat menyebabkan kehilangan gigi (Bodet *et al.*, 2007).

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob Gram-negatif yang terlibat dalam patogenesis periodontitis. Bakteri ini ditemukan dengan prosentase cukup tinggi pada penderita periodontitis kronis yakni sebesar 48% (Mane *et al.*, 2009). Mikroorganisme ini juga merupakan faktor resiko pada penyakit jantung koroner, infeksi paru, kelahiran bayi dengan berat badan rendah (Yilmaz, 2008). *P. gingivalis* menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal dengan pengaktifan respons imun dan inflamatori inang, serta secara langsung mempengaruhi sel-sel periodonsium (Kusumawardani *et al.*, 2010).

Infeksi yang disebabkan oleh bakteri dapat diatasi dengan penggunaan antiseptik. Antiseptik adalah suatu zat yang dapat mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada makhluk hidup. Salah satu contoh antiseptik sintesis yang efektif dalam melawan bakteri Gram positif, Gram negatif serta jamur adalah *chlorhexidine gluconate* (Gupta *et al.*, 2012). Namun *chlorhexidine gluconate* apabila digunakan dalam jangka waktu panjang dapat menimbulkan beberapa efek samping contohnya gangguan pengecap, sensasi rasa terbakar, perubahan warna pada gigi, restorasi, dan membran mukosa serta peningkatan deposit kalkulus (Farah *et al.*, 2009). Oleh karena itu banyak dilakukan penelitian dalam usaha mencari bahan alternatif *chlorhexidine* agar efek sampingnya dapat diminimalisir.

Dewasa ini tanaman obat telah dikembangkan secara luas karena efek sampingnya yang lebih kecil, efektif serta harganya relatif murah (Pathan *et al.*,

2012). Salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai tanaman obat adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle). Jeruk nipis merupakan salah satu tanaman yang dianjurkan Departemen Kesehatan sebagai tanaman obat keluarga (Kurniawati, 2010).

Masyarakat biasanya memanfaatkan jeruk nipis pada buahnya sedangkan daunnya masih kurang dimanfaatkan. Salah satu manfaat dari daun jeruk nipis adalah sebagai antibakteri. Daun jeruk nipis mengandung minyak atsiri, dimana senyawa aktif antibakteri yang terkandung di dalamnya adalah senyawa golongan terpena (Rosyad, 2009). Minyak atsiri pada jeruk (*Rutaceae*) paling banyak terkandung pada kulit buah dan helai daunnya (Gunawan dan Mulyani, 2010). Komposisi minyak atsiri yang dominan ditemukan dalam daun jeruk nipis antara lain *limonene*, *geranial*, *neral* dan *geraniol* (Dongmo *et al.*, 2009).

Aktivitas kerja minyak atsiri dalam menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri yaitu dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel sehingga membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk secara tidak sempurna (Ajizah, 2004). Adapun aktifitas antibakteri senyawa golongan terpena diduga melibatkan pemecahan membran sel bakteri oleh komponen-komponen lipofilik (Bobbarala, 2012).

Beberapa penelitian terdahulu telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri daun jeruk nipis. Ekstrak daun jeruk nipis dan destilasi minyak atsiri daun jeruk nipis menunjukkan aktivitas signifikan terhadap *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini dijelaskan bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daun jeruk nipis. Adapun konsentrasi hambat minimum (KHM) minyak atsiri yang ditemukan pada penelitian tersebut adalah 0,25% (Reddy *et al.*, 2012).

Penelitian lain telah membuktikan bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis juga mempunyai aktivitas hambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada kadar 20%, 40%, dan 80% (Pertiwi, dalam Dalimartha, 2000). Minyak atsiri daun jeruk nipis memiliki daya antibakteri terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi bunuh minimal

(KBM) 0,2 % (Widianawati dalam Rosyad, 2009). Adapun pada penelitian lainnya, minyak atsiri yang diperoleh dari hasil penyulingan daun jeruk nipis memiliki aktivitas antibakteri dengan KBM terhadap *S. aureus* sebesar 0,625% (Normasani dalam Widyarto, 2009).

Berdasarkan uraian di atas, maka muncul pemikiran untuk melakukan penelitian tentang aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk nipis menghambat pertumbuhan *P. gingivalis* yang merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit periodontal. Adapun penelitian ini dilakukan secara *in vitro*, yaitu prosedur uji yang dalam lingkungan terkendali di luar organisme hidup. Uji ini dipilih karena waktunya singkat serta lebih murah karena tidak memerlukan hewan coba.

## 1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dapat dirumuskan dari latar belakang tersebut adalah:

- a. Apakah minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) dapat menghambat pertumbuhan *P. gingivalis*?
- b. Berapa konsentrasi terkecil minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) yang masih dapat menghambat pertumbuhan *P. gingivalis*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui kemampuan minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) dalam menghambat pertumbuhan *P. gingivalis*.
- b. Mengetahui konsentrasi terkecil minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) yang masih dapat menghambat pertumbuhan *P. gingivalis*.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

- a. Memberikan informasi mengenai aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) terhadap *P. gingivalis*.
- b. Memberikan informasi tentang pemanfaatan minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) sebagai alternatif obat kumur dan sediaan per oral lainnya.
- c. Sebagai bahan acuan untuk penelitian lebih lanjut tentang manfaat minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) dalam bidang kesehatan terutama sebagai antibakteri.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob Gram negatif yang terlibat dalam patogenesis periodontitis, suatu penyakit inflamasi yang merusak jaringan pendukung gigi yang akhirnya dapat menyebabkan kehilangan gigi. Diantara lebih dari 500 spesies bakteri yang hidup di rongga mulut, terdapat kompleks bakteri disebut *red complex* terdiri dari *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, dan *Tannerella forsythia* yang dihubungkan dengan lesi periodontal tahap lanjut (Bodet *et al.*, 2007).

*P. gingivalis* ditemukan dengan prosentase cukup tinggi pada penderita periodontitis kronis yakni sebesar 48% (Mane *et al.*, 2009). Mikroorganisme ini juga merupakan faktor resiko pada penyakit jantung koroner, infeksi paru paru, kelahiran bayi dengan berat badan rendah (Yilmaz, 2008). Bakteri ini menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal dengan pengaktifan respons imun dan inflamatori inang, serta secara langsung mempengaruhi sel-sel periodonsium. *P. gingivalis* memproduksi berbagai faktor virulensi patogenik, seperti lipopolisakarida dan hidrogen sulfida, yang dapat menginduksi inang untuk melepaskan IL-1 dan TNF- $\alpha$  (Page dalam Kusumawardani *et al.*, 2010).

#### 2.1.1 Taksonomi *P. gingivalis*

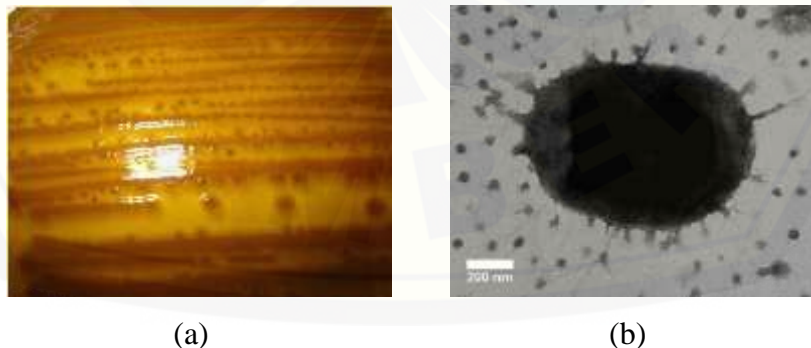
Pada mulanya sebagian besar bakteri anaerob rongga mulut termasuk *Porphyromonas gingivalis* diklasifikasikan dalam genus *Bacteroides*. Namun metode taksonomi lebih lanjut menyatakan bahwa genus *Bacteroides* dibagi menjadi dua kelompok mayor, yaitu *Porphyromonas* dan *Prevotella*, dimana pengelompokan ini didasarkan pada kemampuan untuk memetabolisme gula. (Samaranayake, 2011).

Secara taksonomi, *P. gingivalis* dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Bacteria*  
Superphylum : *Bacteroidetes/Chlorobi group*  
Phylum : *Bacteroidetes*  
Class : *Bacteroidia*  
Ordo : *Bacteroidales*  
Family : *Porphyromonadaceae*  
Genus : *Porphyromonas*  
Spesies : *Porphyromonas gingivalis* (NCBI, 2014)

### 2.1.2 Karakteristik *P. gingivalis*

*P. gingivalis* merupakan bakteri melanogenik, nonsakarolitik, berbentuk batang pleomorfik, mempunyai *fimbriae*, non-motil (tidak punya alat gerak), koloni bakteri berpigmen hitam, Gram negatif, obligat anaerob. Bakteri ini tumbuh dalam media kultur membentuk koloni berdiameter 1-2 mm, konveks, halus dan mengkilat, yang bagian tengahnya menunjukkan gambaran lebih gelap karena produksi *protoheme*, yaitu suatu substansi yang bertanggung jawab terhadap warna khas koloni ini (Gambar 2.1a) (Sha dan Collins dalam Kusumawardani *et al.*, 2010; Samaranayake, 2011). Gambaran mikroskopis *P.gingivalis* dapat dilihat pada Gambar 2.1b.



Gambar 2.1 (a) Koloni *P.gingivalis* ATCC 33277 pada media *blood agar* (Sumber: Kusumawardani *et al.*, 2010). (b) Mikrograf elektron yang menunjukkan vesikel tunas dan *fimbriae* dari *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 (Sumber: *Porphyromonas gingivalis* Genome Project, 2014)



Isolat *P. gingivalis* strain W83 dan ATCC 33277 merupakan strain yang umum dipelajari di laboratorium. Strain W83 dilaporkan lebih sitotoksik dan lebih mudah menyebar pada inang, sementara ATCC 33277 lebih baik pada pembentukan biofilm dan invasi sel inang lokal (Tribble *et al.*, 2013). Strain virulen seperti W83 biasanya menyebabkan lesi nekrotik di lokasi injeksi dalam waktu 24 jam. Strain kurang virulen seperti ATCC 33277 menghasilkan hanya abses lokal 3 hari setelah inokulasi (Naito *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Media Pertumbuhan *P.gingivalis*

*P.gingivalis* dapat tumbuh pada media agar darah (*blood agar*) yang terbuat dari *Trypton Soya Agar* + 5% darah domba (*sheep blood*) dan akuades (Ashshobirin *et al.*, 2014). Selain itu, bakteri ini juga dapat dikultur pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang diperkaya hemin, sistein, vitamin K, dan ekstrak *yeast* (Kadowaki *et al.*, 2004). Hemin berperan dalam proses biologis *P.gingivalis* seperti sintesis lipopolisakarida dan perlindungan stress oksidatif. Penurunan kadar hemin dapat mengakibatkan penurunan ekspresi gen protein penyandi yang terlibat dalam metabolisme energi dan transpor elektron (Bergman *et al.*, 2014). Sebagian besar strain *P.gingivalis* membutuhkan vitamin K sebagai faktor pertumbuhannya (Hojo *et al.*, 2007). Ekstrak *yeast* merupakan sumber nitrogen yang efektif untuk stimulasi pertumbuhan sel bakteri dan meningkatkan produksi H<sub>2</sub> (Hakobyan *et al.*, 2012).

### 2.1.4 Kolonisasi *P. gingivalis*

Perlekatan bakteri ini dibantu oleh berbagai faktor virulensi yang berhubungan dengan penghancuran jaringan dan mekanisme pertahanan terhadap hospes. Faktor virulensi tersebut antara lain :

- a. *Fimbriae*, sebagai perantara utama dalam perlekatan bakteri ke substrat yang tersedia.

- b. Protease, terutama arginin-spesifik yang disebut *gingipain*, yang berfungsi sebagai pendegradasi molekul hospes seperti imunoglobulin, komplemen, protein sekuester hemin, hemolisin, kolagenase dan protein jaringan ikat hospes. Selain itu, protease tersebut dapat berperan dalam jalur tidak langsung untuk menghancurkan jaringan dengan mendegradasi penghambat yang dihasilkan hospes sehingga *P. gingivalis* dapat mengaktifkan jalur kalikrein-kinin yang meningkatkan permeabilitas vaskular untuk menyediakan nutrisi pada sulkus gingiva.
- c. Hemaglutinin, menjadi perantara dalam mengikat bakteri dengan reseptor (oligosakarida) pada sel manusia sehingga inisiasi kolonisasi terjadi.
- d. Kapsular polisakarida, dapat menghambat fagositosis oleh sel imun hospes serta berperan penting dalam perlekatan sel (Michiko *et al.*, 2005).

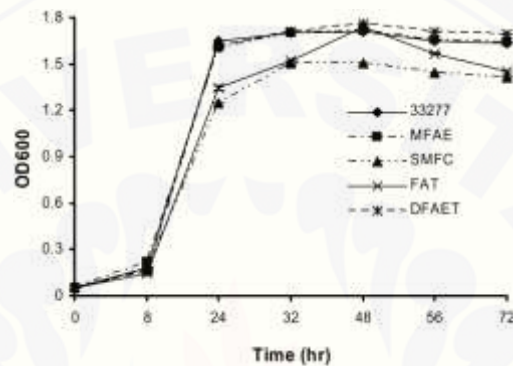
#### 2.1.5 Fase Pertumbuhan *P.gingivalis*

Pertumbuhan mikroba dapat ditandai dengan peningkatan jumlah dan massa sel, sedangkan kecepatan pertumbuhan tergantung pada lingkungan fisik dan kimianya. Pertumbuhan bakteri membentuk pola pembelahan biner. Pertumbuhan bakteri menurut Pelczar dan Chan terdiri atas beberapa fase antara lain :

- a. Fase lamban atau lag. Ciri-ciri fase ini adalah tidak ada pertumbuhan populasi, sel mengalami perubahan dalam komposisi kimiawi, bertambah ukurannya, dan substansi intraselulernya bertambah.
- b. Fase logaritma atau eksponensial, di dalam fase ini sel membelah dengan laju yang konstan, massa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama, aktivitas metabolik seimbang, dan pertumbuhan seimbang. Pertumbuhan seimbang ditandai dengan bertambahnya populasi secara teratur.
- c. Fase stasioner, fase ini ditandai dengan habisnya nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri dalam pertumbuhannya. Hal ini ditandai dengan diproduksinya senyawa atau produk racun yang menyebabkan beberapa sel bakteri mati sedangkan yang lain tumbuh dan membelah sehingga jumlah sel yang hidup menjadi tetap.

d. Fase kematian atau penurunan pertumbuhan yang ditandai dengan sel-sel bakteri menjadi lebih cepat mati daripada terbentuknya sel-sel baru (Dewi, 2014).

Pertumbuhan bakteri diamati dengan cara mengukur *optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm dengan alat spektrofotometer. Berikut ini merupakan kurva pertumbuhan berbagai strain bakteri *P.gingivalis* dijelaskan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Perbandingan kurva pertumbuhan berbagai strain bakteri *P.gingivalis* yang diukur dalam jangka waktu 72 jam (Sumber : Lyn *et al.*, 2006)

## 2.2 Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri yang merugikan manusia (Pelczar dan Chan, 2012). Antibakteri yang ideal harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat tersebut harus bersifat sangat toksik untuk mikroba tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (Gunawan *et al.*, 2007).

Aktivitas antimikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, konsentrasi atau intensitas zat antimikroba, jumlah mikroorganisme, keasaman atau kebasaan (pH), potensi suatu zat antimikroba dalam larutan yang diuji, dan kepekaan suatu mikroba terhadap konsentrasi antibakteri (Pelczar dan Chan, 2012).

### 2.2.1 Mekanisme Kerja Antibakteri

Berdasarkan sifatnya antibakteri dibedakan menjadi dua jenis antara lain :

- a. Bakteriostatik adalah sifat antibakteri yang mampu menghambat multiplikasi bakteri, multiplikasi bakteri dimulai kembali apabila agen antibakteri telah dihilangkan.
- b. Bakterisidal adalah antibakteri yang mampu membunuh bakteri. Perbedaan kerja bakterisidal dan bakteriostatik terletak pada sifat irreversibelnya, organisme yang sudah “dimatikan” tidak lagi dapat bereproduksi meskipun sudah tidak dipapar agen antibakteri lagi. Pada beberapa kasus, agen menyebabkan lisis (melarutkan) sel-sel. Pada kasus lain sel tetap utuh dan mungkin terus aktif secara metabolik. (Brooks *et al.*, 2007).

Aktivitas antibakteri dapat dibagi menjadi lima kelompok antara lain :

- a. Antibakteri yang menghambat metabolisme sel bakteri

Pada mekanisme ini diperoleh efek bakteriostatik. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini adalah sulfonamide, trimetoprim, asam p-aminosalisilat dan sulfon. Kerja antibakteri ini adalah menghambat pembentukan asam folat, bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya dan bakteri memperoleh asam folat dengan mensintesis sendiri dari asam para amino benzoat (PABA). Sulfonamid dan sulfon bekerja bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat. Sedangkan trimetoprim bekerja dengan menghambat enzim dihidrofolat reduktase (Gunawan *et al.*, 2012).

- b. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri

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

menyebabkan lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada bakteri yang peka (Gunawan *et al.*, 2012).

c. Antibakteri yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri

Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah polimiksin, golongan polien serta berbagai antimikroba kemoterapeutik umpamanya antiseptik *surface active agents*. Polimiksin sebagai senyawa amonium kuartener dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Antibiotik polien bereaksi dengan struktur sterol sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut, namun antibiotik ini tidak sensitif terhadap bakteri karena bakteri tidak memiliki sterol pada membran selnya. Antibiotik yang mengubah tekanan permukaan (*surface active agents*), dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain lain (Gunawan *et al.*, 2012).

d. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah golongan makrolid, linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri dari dua subunit yaitu ribosom 30S dan 50S. Streptomisin berkaitan dengan kelompok ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca pada tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya, akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba. Eritromisin berkaitan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru (Gunawan *et al.*, 2012).

e. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini ialah rifampisin, dan golongan kuinolon. Yang lainnya walaupun bersifat antimikroba, karena sifatnya sitotoksitasnya, pada umumnya hanya dapat digunakan sebagai obat antikanker,

tetapi beberapa obat dalam kelompok ini dapat pula digunakan sebagai antivirus. Rifampisin berikatan dengan enzim polimerase-RNA (pada subunit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Golongan kuinolon menghambat enzim DNA girase pada kuman yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa muat dalam sel kuman yang kecil (Gunawan *et al.*, 2012).

### 2.3 Jeruk Nipis

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) merupakan salah satu anggota famili *Rutaceae*, juga dikenal dengan sinonim *Limonia aurantifolia*, *Citrus javanica*, *Citrus notissima*. Di beberapa daerah, jeruk nipis dikenal dengan nama berbeda seperti jeruk pecel (Jawa Tengah/Timur) dan limau asam (Sunda). Buah ini disebut *lime* di Inggris, sementara Spanyol menyebutnya *lima*. Di Arab jeruk ini disebut *limah*, sedangkan di Cina orang menyebutnya *zhi qiao*. Jeruk nipis diduga berasal dari daerah India Utara yang berbatasan dengan Myanmar atau Malaysia bagian utara. Namun, menurut Swingle, jeruk nipis berasal dari yang tumbuh di Eropa dibawa bangsa Arab dari India lewat Persia, Palestina, dan Mesir pada abad ke-13 (Kurniawati, 2010).

#### 2.3.1 Taksonomi Jeruk Nipis

Kedudukan tanaman jeruk nipis dalam sistematika tumbuh tumbuhan adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*  
Subkingdom : *Viridiplantae*  
Divisi : *Tracheophyta*  
Subdivisi : *Spermatophyta*  
Kelas : *Magnoliopsida*

Ordo : *Rutales*  
Famili : *Rutaceae*  
Genus : *Citrus*  
Spesies : *Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle  
(*Integrated Taxonomic Information System*, 2011)

### 2.3.2 Varietas Jeruk Nipis

Jeruk nipis komersial dibedakan atas tiga varietas di Amerika, yaitu key, tahiti dan persia. Varietas key disebut juga *mexican lime* atau *west indian lime*. Varietas tahiti memiliki karakteristik seperti jeruk lemon namun daging buahnya hijau. Varietas persia merupakan jeruk nipis tanpa biji (*seedless lime*). Adapun jeruk nipis yang dibudidayakan di Indonesia tidak jelas varietasnya. Namun di Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Tlekung, Malang, telah dikoleksi kultivar jeruk nipis komersial yang disebut jeruk nipis wajak. Bibit yang dikembangkan adalah bibit jeruk bebas penyakit (Sarwono, 2001).

### 2.3.3 Morfologi Jeruk Nipis

Karakteristik jeruk nipis lokal yaitu pohonnya tumbuh sebagai pohon kecil bercabang lebat, tetapi tidak beraturan. Tajuknya selalu hijau. Tinggi pohon berkisar antara 1,5-5 m. Ranting rantingnya berduri pendek, kaku dan tajam. Daunnya selang seling, berbentuk jorong sampai bundar, dan berukuran (4-8) cm x (2-5) cm. Pinggiran daunnya bergerigi kecil, dan tangkai daunnya bersayap sempit. Bunga jeruk nipis berbentuk tandan pendek, berada di ketiak daun pada pucuk yang baru merekah. Jeruk nipis termasuk tipe buah buni. Bentuknya bulat sampai bulat telur. Diameter buahnya sekitar 3-6 cm. Untuk berkembang, buah jeruk nipis memerlukan waktu 5-6 bulan, sejak muncul bunga sampai siap dipanen. Buah masak pohon akan berubah warna dari

hijau menjadi kuning. Setelah mencapai tahap masak penuh, buah akan jatuh ke tanah (Sarwono, 2001).

Gambaran umum jeruk nipis dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 : Jeruk Nipis (Sumber : Koleksi Pribadi)

#### 2.3.4 Lingkungan Tumbuh Jeruk Nipis

Jeruk nipis dapat beradaptasi dengan baik pada berbagai kondisi lingkungan sehingga cocok dibudidayakan di dataran rendah sampai dataran tinggi (pegunungan), yaitu pada ketinggian antara 1-1.000 m dari permukaan laut (dpl). Kondisi iklim yang ideal untuk budidaya tanaman jeruk nipis adalah kondisi suhu udara  $25^{\circ}$ - $30^{\circ}$  C dengan bulan kering antara 3-5 bulan per tahun, kelembaban udara (RH) 60%-80%, dan tempatnya terbuka. Bila musim kering lebih pendek, tanaman akan berdaun lebat, tetapi sulit berbunga dan berbuah. Kondisi iklim kering selama 3-4 bulan akan merangsang pembungaan. Perkembangan buah membutuhkan iklim kering selama 6-8 minggu.

Tanaman jeruk nipis dapat tumbuh dengan baik di berbagai jenis tanah, mulai dari tanah liat sampai berkerikil. Jenis tanah yang paling cocok bagi tanaman ini adalah tanah latosol, aluvial, dan andosol. Kondisi tanah yang optimal bagi tanaman jeruk nipis adalah tanaman jeruk nipis adalah tanah yang subur, gembur, banyak mengandung humus (bahan organik), berdrainase baik, memiliki kedalaman air tanah



antara 50-200 cm dari permukaan tanah, serta mempunyai pH 5,5-6,0 (kondisi pH optimal antara 6,0-6,8) (Rukmana, 1996).

### 2.3.5 Manfaat Jeruk Nipis

Jeruk nipis biasanya dimanfaatkan untuk minuman dan penyedap masakan. Jeruk nipis juga digunakan untuk perawatan kecantikan dan sebagai pembersih alat rumah tangga. Selain itu, jeruk nipis juga dipakai sebagai bahan ramuan dan obat tradisional karena khasiatnya sebagai penurun demam, pereda batuk, antiinflamasi dan antiseptik (Kurniawati, 2010). Daun jeruk nipis bermanfaat untuk mengobati influenza dan malaria. Infusa daun jeruk nipis dapat diberikan pada demam disertai *jaundice* (pewarnaan kuning pada kulit dan bagian putih mata karena tingginya kadar pigmen empedu), radang tenggorokan, kandidiasis serta dapat meringankan sakit kepala (GlobinMed, 2015).

## 2.4 Minyak Atsiri

Minyak atsiri adalah zat berbau yang terkandung dalam tanaman. Minyak ini disebut juga minyak menguap, minyak eteris, atau minyak esensial. Keberadaan minyak atsiri terutama ditemukan pada tumbuhan famili *Piperaceae*, *Umbelliferae*, *Pinaceae*, *Rutaceae*, dan *Corniferae*. Peranan paling utama dari minyak atsiri terhadap tumbuhan itu sendiri adalah sebagai pengusir serangga dan hewan pemakan daun lainnya sehingga bunga dan daun tidak rusak. Namun, sebaliknya minyak atsiri juga berfungsi sebagai penarik serangga guna membantu penyerbukan (Gunawan dan Mulyani, 2010).

Minyak atsiri dalam keadaan segar dan murni umumnya tidak berwarna, namun pada penyimpanan yang lama minyak atsiri dapat teroksidasi dan membentuk resin serta warna warnanya berubah menjadi lebih tua (gelap). Untuk mencegah supaya tidak berubah warna, minyak atsiri harus terlindungi dari pengaruh cahaya, misalnya

disimpan dalam bejana gelas berwarna gelap. Bejana tersebut diisi se penuh mungkin sehingga tidak memungkinkan berhubungan langsung dengan oksigen udara, ditutup rapat, serta disimpan di tempat yang dingin dan sejuk (Gunawan dan Mulyani, 2010).

Minyak atsiri dapat digunakan sebagai antimikroba tetapi tidak semua minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Minyak atsiri bagi manusia terutama pada dosis yang tinggi atau berlebihan dapat menyebabkan depresi susunan syaraf yang disertai dengan gejala kejang dan kematian. Beberapa jenis minyak atsiri dapat digunakan sebagai bahan antiseptik eksternal dan internal, sebagai bahan analgetik, haemolitik, sedatif, stimulan untuk obat sakit perut dan sebagai obat cacing (Sembiring *et al.*, 2011).

#### 2.4.1 Sifat sifat minyak atsiri

Adapun sifat sifat minyak atsiri adalah sebagai berikut :

- a. Tersusun oleh berbagai komponen senyawa
- b. Memiliki bau khas, umumnya bau ini mewakili bau tanaman asalnya.
- c. Dalam keadaan murni (belum tercemar oleh senyawa lain) mudah menguap pada suhu kamar.
- d. Tidak stabil terhadap pengaruh lingkungan, baik pengaruh oksigen udara, sinar matahari (terutama ultraviolet), dan panas karena terdiri dari berbagai macam komponen penyusun.
- e. Sangat mudah larut dalam pelarut organik, pada umumnya tidak dapat bercampur dengan air (Gunawan dan Mulyani, 2010).

#### 2.4.2 Metode Isolasi Minyak Atsiri

Penyulingan (destilasi) merupakan metode isolasi minyak atsiri yang paling lazim dilakukan. Dalam industri minyak atsiri dikenal tiga macam metode penyulingan yakni sebagai berikut :

a. Penyulingan dengan air (*Water Distillation*)

Pada penyulingan dengan air, bahan yang akan disuling kontak langsung dengan air mendidih (direbus). Bahan tersebut mengapung di atas air atau terendam secara sempurna tergantung dari bobot jenis dan jumlah bahan yang disuling. Metode ini cocok digunakan untuk bahan-bahan yang berbentuk tepung dan bunga-bunga yang mudah menggumpal jika dikenai panas. Metode ini kurang cocok untuk bahan-bahan yang mudah larut dalam air. Minyak yang dihasilkan dari penyulingan dengan air relatif kurang baik mutunya karena adanya kontak langsung antara bahan dengan air yang cenderung mengakibatkan hidrolisis bahan-bahan ester pembentuk minyak atsiri. Waktu yang diperlukan untuk penyulingan dengan air relatif lebih lama dibandingkan dengan metode penyulingan yang lain. Metode penyulingan ini sudah jarang digunakan kecuali untuk bahan-bahan yang tidak dapat disuling dengan penyulingan uap air dan penyulingan uap.

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

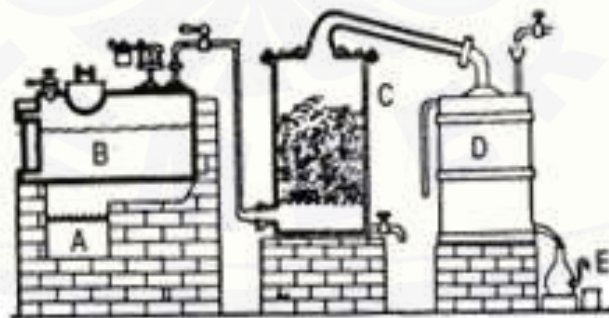
Pada penyulingan uap air, bahan yang akan disuling terletak pada rak/saringan berlubang yang berada di atas air yang mendidih (dikukus). Bahan yang akan disuling hanya berhubungan dengan uap dan tidak berhubungan dengan air panas. Ciri khas penyulingan adalah uap selalu dalam keadaan basah/jenuh dan tidak terlalu panas sehingga peristiwa gosong dapat dihindari. Metode penyulingan ini cocok untuk bahan-bahan berupa rumput, biji, dan daun-daunan. Dibandingkan dengan penyulingan air, metode penyulingan ini lebih unggul karena proses dekomposisi minyak (hidrolisa ester, polimerisasi, dan resinifikasi) lebih kecil. Selain itu, lebih efisien karena jumlah bahan bakar lebih sedikit, waktu penyulingan lebih singkat, dan rendemen minyak yang dihasilkan lebih tinggi. Keuntungan metode penyulingan ini antara lain konstruksi alat sederhana, mudah dirawat, serta biaya pengoperasiannya rendah sehingga cocok untuk industri minyak atsiri skala kecil dan menengah. Kelemahannya yaitu jumlah uap yang dibutuhkan cukup besar. Sejumlah uap akan mengembun dalam jaringan tanaman, sehingga bahan bertambah basah, dan dapat menyebabkan penggumpalan bahan. Penggumpalan akan menghambat penetrasi uap ke dalam bahan

dan dapat menyebabkan terbentuknya jalur uap yang mengakibatkan proses penyulingan kurang sempurna.

c. Penyulingan dengan uap (*Steam Distillation*)

Pada penyulingan dengan uap, sumber uap panas menggunakan *steam boiler* yang letaknya terpisah dari ketel penyuling. Cara penyulingan ini baik digunakan untuk bahan dari biji-bijian, akar atau kayu yang banyak mengandung komponen minyak yang bertitik didih tinggi. Selama proses penyulingan, suhu ketel diawasi agar tidak melampaui suhu *superheated steam*. Hal ini bertujuan untuk menghindari pengeringan bahan yang disuling, yang akan menyebabkan rendemen minyak rendah. Selain itu, tekanan dan suhu yang terlalu tinggi akan menguraikan komponen kimia dan dapat mengakibatkan proses resinifikasi minyak. Metode penyulingan ini kurang baik digunakan untuk bahan yang mengandung minyak atsiri yang mudah rusak oleh pemanasan, terutama minyak atsiri yang berasal dari bunga. Peralatan penyulingan dengan uap umumnya mempunyai konstruksi yang lebih rumit dengan biaya perawatan dan pengoperasiannya yang lebih mahal dibandingkan dengan metode penyulingan yang lain. Penerapan metode ini lebih cocok untuk industri minyak atsiri dalam skala yang besar (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012).

Skema umum penyulingan minyak atsiri dapat dilihat pada Gambar 2.4 berikut ini:



Gambar 2.4 Skema Umum Penyulingan Minyak Atsiri. Keterangan : (a) Tungku (sumber panas); (b) Air untuk menghasilkan uap; (c) Bejana yang digunakan untuk menampung simplisia; (d) Bejana pendingin (e) Penampung minyak atsiri yang bercampur dengan air (Sumber : Gunawan dan Mulyani, 2010)

## 2.5 Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis Sebagai Antibakteri

### 2.5.1 Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis

Jeruk nipis termasuk dalam famili jeruk (*Rutaceae*) dimana kandungan minyak atsiri terbanyak terkandung pada kulit buah dan helai daunnya (Gunawan dan Mulyani, 2010). Jeruk nipis memiliki hubungan kekerabatan dengan jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) yaitu sama sama tergolong pada famili *Rutaceae*. Mengacu pada penelitian Mayasari *et al.*, (2013) destilasi daun jeruk purut menggunakan daun yang segar, berumur tua atau daun yang berwarna hijau tua. Daun yang tua memiliki kandungan minyak atsiri lebih banyak daripada daun yang muda serta mengandung kadar air yang rendah. Adapun rendemen daun jeruk purut yang basah lebih tinggi dari pada daun jeruk purut yang kering.

Beberapa faktor saat panen dan pasca panen dapat mempengaruhi kualitas minyak atsiri. Panen sebaiknya dilakukan pada pagi hari atau sore hari agar daun tetap mengandung minyak atsiri yang tinggi. Apabila dilakukan pada siang hari maka sel-sel daun akan melakukan proses metabolisme yang akan mengurangi laju pembentukan minyak dan daun kurang elastis, sehingga kehilangan minyak akan lebih besar karena daun mudah sobek. Begitu pula dengan adanya transpirasi daun yang lebih cepat menyebabkan jumlah minyak yang dihasilkan akan berkurang (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012).

Waktu pemanenan daun hendaknya dilakukan pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal, yaitu ditandai dengan saat-saat tanaman mulai berbunga atau buah sudah mulai masak. Adapun bahan berupa daun atau bunga yang akan diambil minyak atsirinya, maka cara pengeringan yang dilakukan adalah menghindari proses penguapan terlalu cepat dan proses oksidasi udara (Gunawan dan Mulyani, 2010). Selain itu, daun yang akan diambil minyak atsirinya sebaiknya dilakukan pemotongan (pengecilan ukuran). Proses pengecilan ukuran ini bertujuan agar kelenjar minyak dapat terbuka sebanyak mungkin sehingga pada proses destilasi dapat dengan mudah melewati jaringan tanaman dan mendesak minyak atsiri kepermukaan (Mayasari *et al.*, 2013).

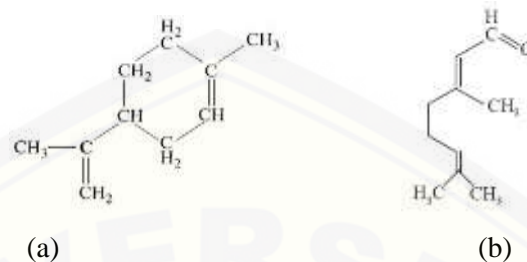
Komposisi minyak atsiri daun jeruk nipis yang dianalisis dengan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) dapat dilihat pada Tabel 2.1 berikut :

Tabel 2.1 Komposisi minyak atsiri daun jeruk nipis

Komposisi	Persentase
<b>Monoterpen hidrokarbon</b>	
$\alpha$ -Pinene	0,34%
Camphene	2,25%
Sabinene	1,18%
$\beta$ -Pinene	0,32%
Myrcene	1,47%
$\delta$ -3-carenene	0,30%
Limonene	43,53%
Z- $\beta$ -ocimene	2,73%
$\gamma$ -Terpinene	0,26%
Terpinolene	1,50%
Isocamphenel	0,45%
<b>Monoterpene Teroksigenasi</b>	
E-pinocarveol	1,72%
Borneol	0,64%
Terpinen-4-ol	0,63%
Myrterial	0,33%
$\alpha$ -terpineol	0,35%
Citronellol	1,27%
Nerol	2,65%
Neral	10,00%
Geraniol	4,02%
Geranial	12,57%
Neryl Acetate	1,92%
Geranyl Acetate	3,24%
<b>Sesquiterpen Hidrokarbon</b>	
$\beta$ -elemene	1,03%
$\beta$ -caryophyllene	2,62%
$\alpha$ -humulene	0,45%
germacrene D	0,54%
$\beta$ -bisabolene	0,40%
$\sigma$ -cadinene	0,25%
<b>Sesquiterpen Teroksigenasi</b>	
Caryophyllene oxide	0,43%
$\sigma$ -eudesmol	0,34%

Sumber : Dongmo *et al* (2009)

Struktur kimia senyawa terpena yang dominan ditemukan pada minyak atsiri daun jeruk nipis dapat dilihat pada Gambar 2.5 berikut ini



Gambar 2.5 Struktur kimia (a) *limonene* ; (b) *geranial* (Sumber : Chemistry and Biology Journal at Bedford School, 2014; Pharmacognosy, 2012)

### 2.5.2 Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis

Beberapa penelitian terdahulu telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri daun jeruk nipis. Ekstrak daun jeruk nipis dan destilasi minyak atsiri daun jeruk nipis menunjukkan aktivitas signifikan terhadap sembilan bakteri patogenik pada manusia antara lain *Bacillus cereus*, *Enterobacter faecalis*, *Salmonella paratyphi*, *S. aureus*, *Eschericia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Serratia marescens*. Pada penelitian ini dijelaskan bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun jeruk nipis. Adapun aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk nipis tergantung oleh konsentrasi yang digunakan. Konsentrasi hambat minimum (KHM) minyak atsiri yang ditemukan pada penelitian tersebut adalah 0,25% (Reddy *et al.*, 2012).

Penelitian lain telah membuktikan bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis juga mempunyai aktivitas hambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada kadar 20%, 40%, dan 80% serta *E. coli* pada kadar 40% dan 80%. (Pertiwi, dalam Dalimartha, 2000). Minyak atsiri daun jeruk nipis memiliki daya antibakteri terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi bunuh minimal (KBM) 0,2 % (Widianawati dalam Rosyad, 2009). Adapun pada penelitian lainnya, minyak atsiri dari penyulingan daun jeruk nipis memiliki

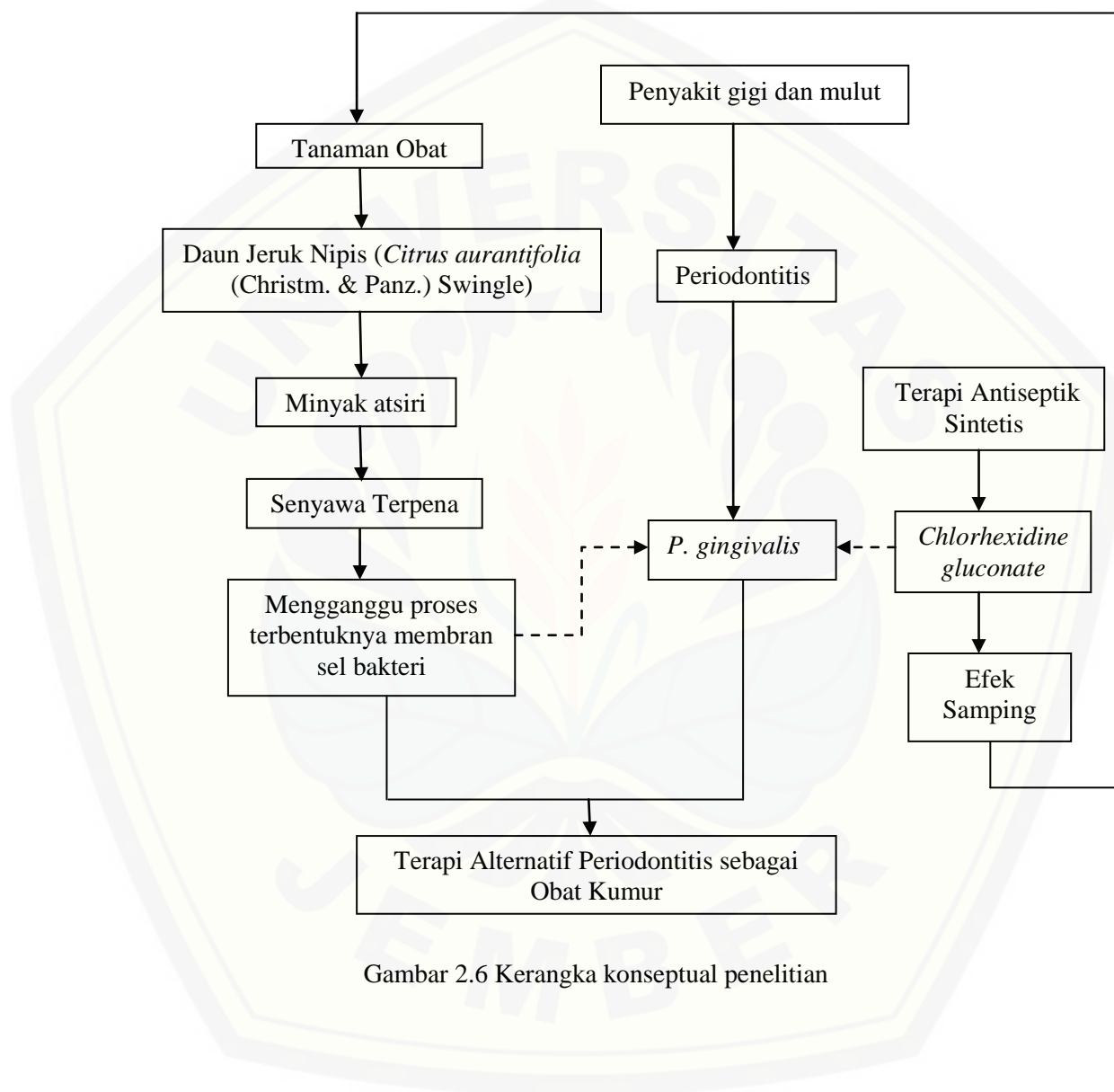
aktivitas antibakteri dengan konsentrasi bunuh minimal terhadap *S. aureus* sebesar 0,625% dan *E. coli* sebesar 1,25% (Normasani dalam Widyarto, 2009).

Aktivitas kerja minyak atsiri dalam menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri yaitu dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel, membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk secara tidak sempurna (Ajizah, 2004). Senyawa aktif antibakteri dalam minyak atsiri daun jeruk nipis adalah senyawa golongan terpena (Rosyad, 2009). Aktifitas antibakteri terpena diduga melibatkan pemecahan membran sel bakteri oleh komponen-komponen lipofilik (Bobbarala, 2012). Senyawa terpena bekerja dengan merusak porin (protein transmembran) pada bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Salni *et al.*, 2011).



## 2.6 Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual penelitian ini dapat dilihat dalam Gambar 2.6 berikut :



Gambar 2.6 Kerangka konseptual penelitian

## 2.7 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. gingivalis*.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Adapun rancangan penelitian yang digunakan *the post test only control group design* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dan kontrol.

### 3.2 Tempat Penelitian

- a. Identifikasi spesies jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) dilakukan di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi Jl. Raya Surabaya Malang Km. 65, Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur.
- b. Pengambilan minyak atsiri daun jeruk nipis dengan cara destilasi uap air dilakukan di Laboratorium Rekayasa Proses dan Pengolahan Hasil Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
- c. Identifikasi kultur murni *P. gingivalis* dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk nipis terhadap *P. gingivalis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

### 3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Januari 2015

### 3.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas dari penelitian ini adalah destilat minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% (Ashgari *et al.*, 2012).

- b. Variabel terikat dari penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan *P. gingivalis*.
- c. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suspensi *P. gingivalis*, media pertumbuhan *P. gingivalis*, suhu inkubasi, lama inkubasi, sterilisasi alat dan bahan, kriteria daun jeruk nipis.

### 3.5 Definisi Operasional

- a. Minyak atsiri daun jeruk nipis diperoleh dari daun jeruk nipis yang telah dipotong-potong kemudian dilakukan destilasi uap air. Daun sebanyak 1,7 kg diletakkan di atas saringan berlubang pada tabung destilasi yang telah diisi air sebanyak 6 liter, kemudian dilakukan pemanasan selama 5 jam. Destilat yang diperoleh merupakan campuran minyak dengan air yang ditampung dalam kondensor, selanjutnya minyak dan air dipisahkan dengan corong pisah. (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012).
- b. Diameter zona hambat pertumbuhan *P. gingivalis* adalah diameter daerah bening atau jernih sekitar lubang sumuran (Pangalanan *et al.*, 2012).
- c. *P. gingivalis* diambil dari kultur murni strain ATCC 33277 koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
- d. Kriteria daun jeruk nipis yang diambil yaitu daun yang segar, telah membuka sempurna, berwarna hijau tua (petikan ke 3-5), berumur 4 tahun, dipetik pada pagi hari (pukul 9.00) pada cuaca kering (tidak hujan/mendung) (Mayasari *et al.*, 2013; Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012).

### 3.6 Sampel Penelitian

Besar sampel pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus perhitungan jumlah sampel menurut Federer (Wahyuningrum dan Probosari, 2012) adalah sebagai berikut:

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

Keterangan :

n : jumlah pengulangan

t : jumlah perlakuan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times (6-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 5 \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Sampel yang akan digunakan dibagi menjadi 6 kelompok yaitu :

- a. Kelompok K(-) : kontrol negatif (Larutan Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10% + Tween 80 0,5%)
- b. Kelompok K(+) : kontrol positif (*Chlorexidine gluconate* 0,2%)
- c. Kelompok J100 : minyak atsiri daun jeruk nipis konsentrasi 100%
- d. Kelompok J50 : minyak atsiri daun jeruk nipis konsentrasi 50%
- e. Kelompok J25 : minyak atsiri daun jeruk nipis konsentrasi 25%
- f. Kelompok J12,5 : minyak atsiri daun jeruk nipis konsentrasi 12,5%

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus diatas, diperoleh pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap kelompok. Sehingga jumlah sampel total pada penelitian ini adalah 24 lubang sumuran.

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah :

- a. *Petridish* tidak bersekat
- b. Ose
- c. Gigaskrin
- d. Tabung Erlenmeyer (Schoot Duran, Germany)
- e. Bunsen (Pyrex, Japan)
- f. Tabung reaksi (Pyrex, Japan)
- g. *Beaker glass* (Pyrex, Japan)
- h. Jangka sorong (Inoki, Japan)
- i. *Thermolyne* (Maxi Mix II, Dubuque, IOWA, USA)
- j. Mikropipet (Eppendorf, Germany)
- k. *Disposable syringe* (OneMed, Indonesia)
- l. Spektrofotometer (Milton Roy, Spectronic 20+, Germany)
- m. *Laminar flow* (tipe HF-100, Korea)
- n. *Incubator* (Binder, tipe 175053099003100, Germany)
- o. *Autoclave* (Mettler, Germany)
- p. *Oven* (Binder tipe FED 720, Germany)
- q. *Desicator* (Kartell, Italy)
- r. *Steril cork borer* berdiameter 5 mm
- s. Satu set alat destilasi uap meliputi tabung destilasi, kondensator dan tabung pendingin balik (Corning)
- t. Kertas label (Phoenix)
- u. Spidol

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Kultur murni *P. gingivalis* ATCC 33277
- b. Dimetil sulfoksida (DMSO)
- c. Tween 80

- d. Chlorhexidine gluconate 0,2% (Minosep, Bogor, Indonesia)
- e. BHI-A (*Brain Heart Infusion Agar*) (Merck, *Germany*)
- f. BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*) (Merck, *Germany*)
- g. NaOH 1N
- h. Aquadest Steril
- i. Ethanol 95%
- j. Hemin Chloride (MP Biomedicals, *France*)
- k. Vitamin K/*Menadione* (MP Biomedicals, *France*)
- l. Ekstrak *yeast* (Merck, *Germany*).
- m. Alkohol 70%
- n. Daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) yang diambil di kebun milik Bapak Darto, Jl. Urip Sumoharjo 24, Tanggul, Jember, Jawa Timur.

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Tahap Persiapan

##### a. Sterilisasi alat

Semua alat yang terbuat dari kaca misalnya erlenmeyer, tabung reaksi dan lain lain disterilkan dengan *oven* dengan suhu 110° C selama 15 menit, sedangkan semua alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih dan dikeringkan kemudian diulas alkohol 70%.

##### b. Proses destilasi uap air minyak atsiri daun jeruk nipis

Proses pengambilan minyak atsiri daun jeruk nipis dilakukan dengan metode destilasi uap air (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012). Daun jeruk nipis dipotong kecil kecil setelah itu ditimbang sebanyak 1,7 kg. Tabung destilasi diisi air sebanyak  $\frac{3}{4}$  tinggi tabung destilasi yaitu 6 liter. Daun jeruk nipis diletakkan diatas saringan berlubang dalam tabung destilasi yang telah berisi air, lalu tabung ditutup rapat untuk

menghindari kebocoran. Tabung destilasi lalu dihubungkan dengan kondensor dan tabung pendingin balik. Pendingin balik dialiri air kran secara terus menerus sampai destilasi selesai. Kompor gas dihubungkan ke tabung dan dihidupkan serta diatur besar kecilnya api pemanasan. Pemanasan berjalan sekitar 5 jam. Pemanasan akan membuat air dalam tabung destilasi dan minyak atsiri dalam daun menguap, namun segera terembunkan kembali dalam tabung pendingin. Destilat yang diperoleh merupakan campuran minyak dengan air yang ditampung dalam kondensor. Selanjutnya minyak dan air dipisahkan dengan corong pisah. Minyak yang diperoleh ditempatkan dalam botol gelap yang tertutup rapat kemudian disimpan dalam lemari es.

c. Pembuatan kontrol negatif

Kontrol negatif yang dipakai pada penelitian ini adalah larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan, larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% tidak mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P.gingivalis*, ditandai dengan tidak adanya zona hambat di sekeliling lubang sumuran. Cara pembuatan larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% dapat dilihat pada Lampiran G (hal. 62).

d. Pengenceran minyak atsiri daun jeruk nipis

Proses pengenceran minyak atsiri daun jeruk nipis dilakukan dengan metode *serial dilution* dengan pelarut larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%. *Serial dilution* adalah metode pengenceran bertahap dari suatu zat dalam larutan. Konsentrasi minyak atsiri daun jeruk nipis yang dibuat dalam penelitian ini adalah 100%, 50%, 25%, 12,5% (Ashgari *et al.*, 2012). Pada uji pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya, konsentrasi 6,25% tidak memperlihatkan adanya zona hambat (terlihat seperti kontrol negatif). Oleh karena itu konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%.

Pengenceran minyak atsiri daun jeruk nipis dengan metode *serial dilution* adalah sebagai berikut :

1. Ambil minyak atsiri daun jeruk nipis konsentrasi 100% sebanyak 1000  $\mu$ l dengan mikropipet, masukkan pada tabung reaksi.
2. Minyak atsiri konsentrasi 50% dibuat dengan cara mencampurkan 500  $\mu$ l minyak atsiri konsentrasi 100% dengan 500  $\mu$ l larutan kontrol negatif.
3. Minyak atsiri konsentrasi 25% dibuat dengan cara mencampurkan 500  $\mu$ l minyak atsiri konsentrasi 50% dengan 500  $\mu$ l larutan kontrol negatif.
4. Minyak atsiri konsentrasi 12,5% dibuat dengan cara mencampurkan 500  $\mu$ l minyak atsiri konsentrasi 25% dengan 500  $\mu$ l larutan kontrol negatif.

Setelah dilakukan pengenceran, setiap tabung dikocok dengan menggunakan *thermolyne* agar minyak atsiri dan pengencernya dapat bercampur dengan homogen.

e. Identifikasi kultur murni *P. gingivalis*

Identifikasi dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan preparat ulas yang diberi pewarnaan Gram untuk memastikan kemurnian *P. gingivalis*. Hasil identifikasi bakteri *P.gingivalis* dapat dilihat pada Lampiran A (hal.51-52).

f. Mempersiapkan media pertumbuhan *P. gingivalis*

Semua tahapan persiapan media ini dilakukan dalam *laminar flow* untuk mencegah kontaminasi dari lingkungan luar.

1. Pembuatan hemin yaitu dengan mencampurkan 50 mg hemin ditambah 1 ml cairan NaOH 1N dan aquadest steril 100 ml.
2. Pembuatan vitamin K yaitu dengan mencampurkan 0,15 ml vitamin K ditambah 30 ml cairan etanol 95%.
3. Pembuatan ekstrak *yeast* yaitu dengan mencampurkan 3,5 gr ekstrak *yeast* ditambah 100 ml aquadest steril dipanaskan.
4. Pembuatan media BHI-B dengan cara menimbang BHI-B sebanyak 0,37 gram lalu dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer dan ditambah 10 ml aquadest steril,



diaduk sampai homogen dengan spatula dan dipanaskan diatas kompor listrik sampai homogen. Kemudian media ditutup kapas dan disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C. Setelah disterilkan, media tersebut ditambah 1 µl vitamin K, 5 µl hemin, dan 50 µl ekstrak *yeast*, selanjutnya dipanaskan kembali di atas kompor listrik sampai homogen.

5. Pembuatan BHI-A dengan cara menimbang BHI-A sebanyak 3,7 gram lalu dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan ditambahkan 100 ml aquadest steril, diaduk sampai homogen dengan spatula dan dipanaskan diatas kompor listrik sampai homogen. Kemudian media ditutup kapas dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121° selama 15 menit. Kemudian setelah disterilkan, media tersebut ditambah 10 µl vitamin K, 50 µl hemin, dan 500 µl ekstrak *yeast*, selanjutnya dipanaskan kembali di atas kompor listrik sampai homogen.

f. Membuat suspensi *P. gingivalis*

Satu ose *P. gingivalis* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2ml BHI-B yang telah diperkaya vitamin K, hemin dan ekstrak *yeast*, kemudian tabung reaksi ditutup kapas dan dimasukkan dalam desikator untuk menciptakan suasana anaerob. Selanjutnya desikator dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 2x24 jam. Setelah itu suspensi dihomogenkan di atas *thermolyne* dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan standar *Mc Farland* 0,5 atau setara dengan  $3 \times 10^6$  CFU/ml.

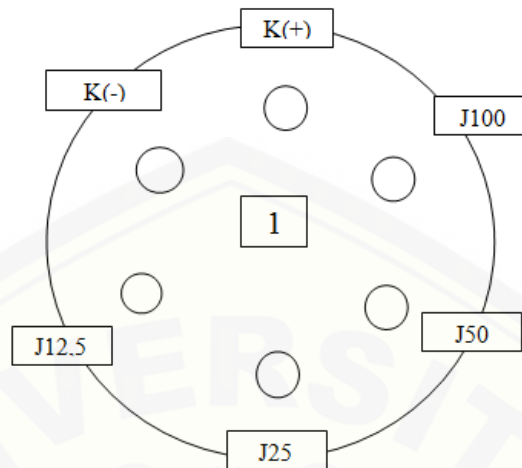
g. Pemberian label pada bagian bawah *petridish*

Label J100, J50, J25 dan J12,5 ditempel pada bagian bawah *petridish* sesuai konsentrasi minyak atsiri yang dipakai pada perlakuan. Label K(+) untuk kontrol positif (*Chlorhexidine gluconate* 0,2%), label K(-) untuk kontrol negatif (larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%).

### 3.8.2 Tahap perlakuan

Semua perlakuan dilakukan di dalam *laminar flow* untuk mencegah kontaminasi dengan lingkungan luar.

- a. Media BHI-A yang masih hangat pada suhu 45°-50°C sebanyak 25 ml dituangkan ke dalam setiap *petridish* hingga mencapai ketebalan 4 mm. Suspensi *P. gingivalis* diambil dari tabung reaksi sebanyak 0,5 ml diinokulasikan pada media tersebut dengan menggunakan *syringe*, ratakan dengan gigaskrin lalu tunggu sampai memadat dan dingin.
- b. Metode pengujian yang digunakan adalah metode difusi sumuran (*well diffusion method*). Pada media yang telah diinokulasi dengan *P. gingivalis* dibuat lubang sumuran dengan menggunakan *steril cork borer* berdiameter 5 mm. Adapun pembuatan lubang sumuran mengikuti susunan pada Gambar 3.1
- c. Minyak atsiri dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dimasukkan sebanyak 10 µl dalam setiap lubang sumuran sesuai dengan label di bawah *petridish*. Hal serupa juga dilakukan pada kelompok kontrol positif (*Chlorhexidine gluconate* 0,2%) dan kontrol negatif (larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%).
- d. *Petridish* didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruangan agar minyak atsiri dapat berdifusi dengan baik pada media (Joshi, 2010). Setelah itu semua *petridish* dengan keadaan terbalik dimasukkan desikator yang diberi lilin menyala untuk mendapatkan suasana anaerob, kemudian desikator diletakkan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam dan 48 jam. Pengamatan dilakukan pada 24 jam dan 48 jam.



Gambar 3.1 Skema pembagian daerah pada *petridish*

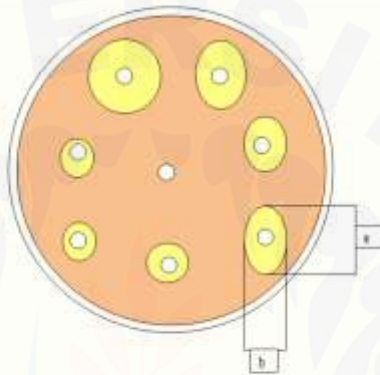
Keterangan :

- |       |   |
|-------|---|
| 1     | : Penomoran <i>petridish</i>  |
| J100  | : Kertas label untuk minyak atsiri daun jeruk nipis 100%                    |
| J50   | : Kertas label untuk minyak atsiri daun jeruk nipis 50%                     |
| J25   | : Kertas label untuk minyak atsiri daun jeruk nipis 25%                     |
| J12,5 | : Kertas label untuk minyak atsiri daun jeruk nipis 12,5%                   |
| K(+)  | : Kertas label untuk kontrol positif ( <i>Chlorhexidine gluconate</i> 0,2%) |
| K(-)  | : Kertas label untuk kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%)     |
| ○     | : Lubang sumuran  |

### 3.8.3 Tahap Pengukuran

Setelah diinkubasi, *petridish* yang telah diberi perlakuan dikeluarkan dari desikator kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong digital. Pengamatan zona hambat dilakukan tiap 24 jam dan 48 jam. Pengukuran dilakukan oleh 3 orang pengamat yang berbeda lalu diambil rata-rata. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (Joshi *et al.*,2009).

Jika zona hambat berbentuk lingkaran maka pengukuran dilakukan dengan mengukur diameter dari zona hambat. Jika zona hambat berbentuk lonjong, maka pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat yang panjang (misal a mm) dan diameter zona hambat yang pendek (misal b mm) kemudian keduanya dijumlah dan dibagi dua. Jadi diameter zona hambatnya =  $\frac{a+b}{2}$  (Majidah *et al.*, 2014). Cara pengukuran selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Cara pengukuran diameter zona hambat dengan mengukur diameter terpanjang (a) dan diameter terpendek (b)

#### 3.8.4 Analisis Data

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas *Levene*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen ( $p > 0,05$ ) maka dilakukan uji parametrik dengan *One Way Anova* (Anova Satu Arah) kemudian dilanjutkan dengan uji *LSD* (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui besarnya perbedaan antar kelompok. Tetapi jika datanya tidak terdistribusi normal atau tidak homogen maka dilakukan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis* ( $p < 0,05$ ) kemudian dilanjutkan dengan uji statistik *Mann Whitney* ( $p < 0,05$ ).

### 3.9 Alur Penelitian

