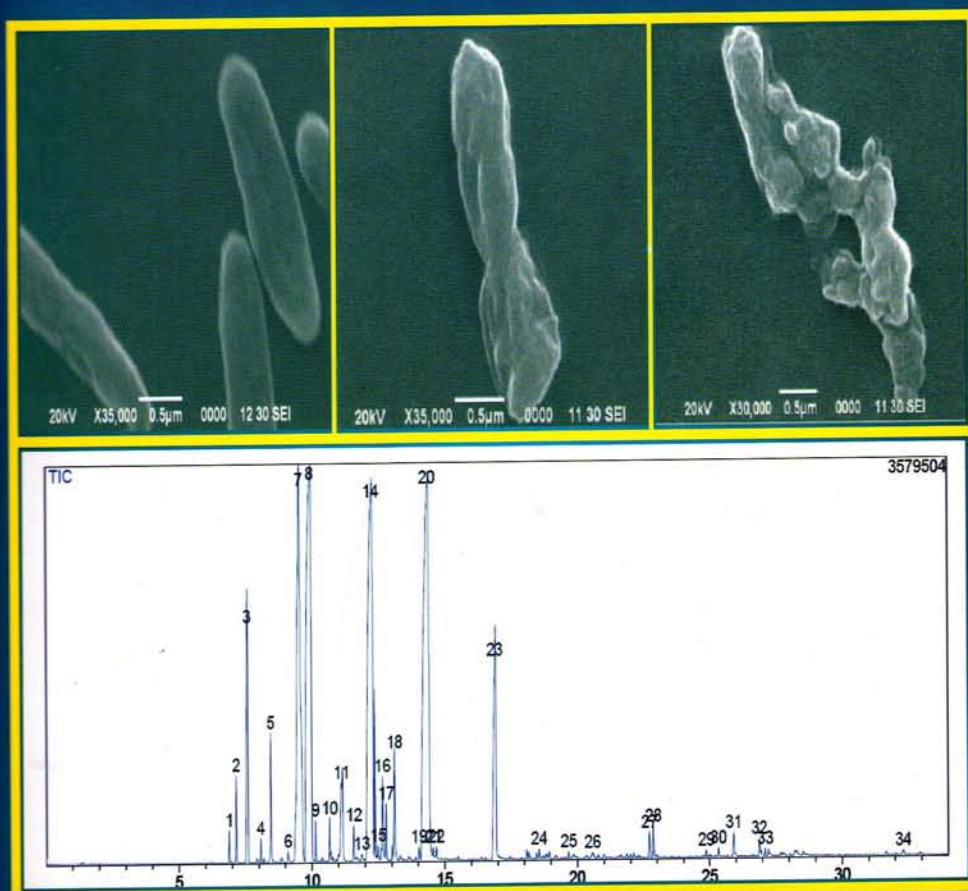


Berita Biologi

Jurnal Ilmiah Nasional



Diterbitkan Oleh
Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Berita Biologi merupakan Jurnal Ilmiah ilmu-ilmu hayati yang dikelola oleh Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), untuk menerbitkan hasil karya-penelitian (original research) dan karya-pengembangan, tinjauan kembali (review) dan ulasan topik khusus dalam bidang biologi. Disediakan pula ruang untuk menguraikan seluk-beluk peralatan laboratorium yang spesifik dan dipakai secara umum, standard dan secara internasional. Juga uraian tentang metode-metode berstandar baku dalam bidang biologi, baik laboratorium, lapangan maupun pengolahan koleksi biodiversitas. Kesempatan menulis terbuka untuk umum meliputi para peneliti lembaga riset, pengajar perguruan tinggi maupun pekarya-tesis sarjana semua strata. Makalah harus dipersiapkan dengan berpedoman pada ketentuan-ketentuan penulisan yang tercantum dalam setiap nomor.

Diterbitkan 3 kali dalam setahun yakni bulan April, Agustus dan Desember. Setiap volume terdiri dari 6 nomor.

Surat Keputusan Ketua LIPI

Nomor: 1326/E/2000, Tanggal 9 Juni 2000

Dewan Pengurus

Pemimpin Redaksi

B Paul Naiola

Anggota Redaksi

Andria Agusta, Dwi Astuti, Hari Sutrisno, Iwan Saskiawan
Kusumadewi Sri Yulita, Marlina Ardiyani, Tukirin Partomihardjo

Desain dan Komputerisasi

Muhamad Ruslan, Yosman

Distribusi

Budiarjo

Sekretaris Redaksi/Korespondensi Umum

(berlangganan dan surat-menyurat)

Enok, Ruswenti

Pusat Penelitian Biologi - LIPI
Kompleks Cibinong Science Centre (CSC-LIPI)
Jin Raya Jakarta-Bogor Km 46,
Cibinong 16911, Bogor - Indonesia
Telepon (021) 8765066 - 8765067
Faksimili (0251) 8765063
Email: herbogor@indo.net.id
ksama_p2biologi@yahoo.com

Keterangan foto/ gambar cover depan: *Perbandingan tingkat kerusakan dinding sel Escherichia coli yang diperlakukan dengan minyak atsiri temu kunci (Kaempferia pandurata), dan kromatogramnya yang dihasilkan dengan GC-MS sesuai makalah di halaman 1 (Foto: koleksi Universitas Sriwijaya/ Institut Pertanian Bogor - Miksusanti).*



LIPI

Berita Biologi

Jurnal Ilmiah Nasional

ISSN 0126-1754

Volume 9, Nomor 1, April 2008

Terakreditasi

SK Kepala LIPI

Nomor 14/Akred-LIPI/P2MBI/9/2006

**Diterbitkan oleh
Pusat Penelitian Biologi - LIPI**

Ketentuan-ketentuan untuk Penulisan dalam Jurnal Berita Biologi

1. Karangan ilmiah asli, *hasil penelitian* dan belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain.
2. Bahasa Indonesia. Bahasa Inggris dan asing lainnya, dipertimbangkan.
3. Masalah yang diliput, diharapkan aspek "baru" dalam bidang-bidang
 - Biologi dasar (*pure biology*), meliputi turunan-turunannya (mikrobiologi, fisiologi, ekologi, genetika, morfologi, sistematik dan sebagainya).
 - Ilmu serumpun dengan biologi: pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan air tawar dan biologi kelautan, agrobiologi, limnologi, agro bioklimatologi, kesehatan, kimia, lingkungan, agroforestri. *Aspek/pendekatan biologi* harus tampak jelas.
4. Deskripsi masalah: harus jelas adanya tantangan ilmiah (*scientific challenge*).
5. Metode pendekatan masalah: standar, sesuai bidang masing-masing.
6. Hasil: hasil temuan harus jelas dan terarah.
7. Kerangka karangan: standar.
Abstrak dalam bahasa Inggris, maksimum 200 kata, spasi tunggal, ditulis miring, isi singkat, padat yang pada dasarnya menjelaskan masalah dan hasil temuan. *Hasil dipisahkan dari Pembahasan.*
8. Pola penyusunan makalah: spasi ganda (kecuali abstrak), pada kertas berukuran A4 (70 gram), maksimum 15 halaman termasuk gambar/foto; pencantuman Lampiran seperlunya.
Gambar dan foto: harus bermutu tinggi, gambar pada kertas kalkir (bila manual) dengan tinta Cina, berukuran kartu pos; foto berwarna, sebutkan programnya bila dibuat dengan komputer.
9. Kirimkan 2 (dua) eksemplar makalah ke Redaksi (alamat pada cover depan-dalam) yang ditulis dengan program Microsoft Word 2000 ke atas. Satu eksemplar tanpa nama dan alamat penulis (-penulis)nya. Sertakan juga copy file dalam CD (bukan disket), untuk kebutuhan Referee secara elektronik. Jika memungkinkan, kirim juga filenya melalui alamat elektronik (E-mail) Berita Biologi: herbogor@indo.net.id dan [ksama_p2biologi\(3\),yahoo.com](mailto:ksama_p2biologi(3),yahoo.com)
10. Cara penulisan sumber pustaka: tuliskan nama jurnal, buku, presiding atau sumber lainnya secara lengkap, jangan disingkat. Nama inisial pengarang tidak perlu diberi tanda titik pemisah.
 - a. Jurnal
Premachandra GS, H Saneko, K Fujita and S Ogata. 1992. Leaf Water Relations, Osmotic Adjustment, Cell Membrane Stability, Epicuticular Wax Load and Growth as Affected by Increasing Water Deficits in Sorghum. *Journal of Experimental Botany* 43, 1559-1576.
 - b. Buku
Kramer PJ. 1983. *Plant Water Relationship*, 76. Academic, New York.
 - c. Presiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya dan sebagainya
Hamzah MS dan SA Yusuf. 1995. Pengamatan Beberapa Aspek Biologi Sotong Buluh (*Sepioteuthis lessoniana*) di Sekitar Perairan Pantai Wokam Bagian Barat, Kepulauan Am, Maluku Tenggara. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XI*, Ujung Pandang 20-21 Juli 1993. M Hasan, A Mattimu, JG Nelwan dan M Littay (Penyunting), 769-777. Perhimpunan Biologi Indonesia.
 - d. Makalah sebagai bagian dari buku
Leegood RC and DA Walker. 1993. Chloroplast and Protoplast. Dalam: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. DO Hall, JMO Scurlock, HR Bohler Nordenkampf, RC Leegood and SP Long (Eds), 268-282. Chapman and Hall. London.
11. Kirimkan makalah serta copy file dalam CD (lihat butir 9) ke Redaksi. Sertakan alamat Penulis yang jelas, juga meliputi nomor telepon (termasuk HP) yang mudah dan cepat dihubungi dan alamat elektroniknya.

Berita Biologi menyampaikan terima kasih
kepada para Mitra Bestari/Penilai (Referee) nomor ini
9(1)-April 2008

Prof. Dr. Adek Zamrud Adnan (Farmasi, FMIPA-Universitas Andalas)
Dr. Andria Agusta (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Dr. B Paul Naiola (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Drs. Edy Mirmanto, MSc (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Dr. Erdy Santoso (Puslitbang Hutan dan Konservasi Alam
Departemen Kehutanan)
Dr. Hah Sutrisno (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Dr. Herman Daryono (Puslitbang Hutan dan Konservasi Alam
Departemen Kehutanan)
Dr. Iwan Saskiawan (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Ir. Maria Imelda, MSc (Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI)
Dra. Nunuk Widhyastuti, MSi (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Dr. Nuril Hidayati (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Dr. Nyoman Mantik Astawa (Departemen Virologi FKH -Universitas Udayana)

DAFTAR ISI

MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

KERUSAKAN DINDING SEL <i>Escherichia coli</i> K1.1 OLEH MINYAK ATSIRI TEMU KUNCI (<i>Kaempferia pandurata</i>) [Cell Wall Disruption of <i>Escherichia coli</i> K1.1 by Temu Kunci (<i>Kaempferia pandurata</i>) Essential Oil] Miksusanti, Betty Sri Laksmi Jennie, Bambang Ponco dan Gatot Trimulyadi.....	1
KERAGAMAN AKTINOMISETES KEPULAUAN WAIGEO, KABUPATEN RAJA AMPAT, PAPUA DAN POTENSINYA SEBAGAI PENDEGRADASI SELULOSA DAN PELARUT FOSFAT [Actinomycetes Diversity in Waigeo Island, Raja Ampat Regency, Papua and Their Potentials as Cellulose Degradation and Phosphate Solubilization] ArifNurkanto.....	9
POTENSI IKAN MUJAIR (<i>Sarotherodon mossambica</i>) SEBAGAI BIOAKUMULATOR PENCEMARAN PESTISIDA PADA LINGKUNGAN PERTANIAN [The Potential of Mujair Fish (<i>Sarotherodon mossambica</i>) as Bioaccumulator of Pesticides Contamination in Agricultural Land] Yulvian Sani dan Indraningsih.....	19
PEMBUATAN STARTER UNTUK EKSTRAKSI MINYAK KELAPA MURNI MENGGUNAKAN MIKROBA AMILOLITIK [Preparation of Starter for Extracting Virgin Coconut Oil by Using Amylolytic Microbes] ElidarNaiola.....	31
RETRANSFORMATION AND EXPRESSION OF RECOMBINANT VIRAL PROTEIN OF JEMBRANA SU AND Tat (JSU AND JTat) IN pGEX SYSTEM [Retransformasi dan Ekspresi Protein Virus Rekombinan JSU dan JTat Penyakit Jembrana dalam Sistem pGex] Endang T Margawati, Andi Utama and Indriawati.....	39
POPULASI POHON JENIS DIPTEROCARPACEAE DI TIGA TIPE HUTAN PAMAH KALIMANTAN [Tree Population of Dipterocarpaceae Species in Three Vegetation Types of Lowland Forests Kalimantan] Herwint Simbolon.....	45
DAUR PATOLOGIS TEGAKAN HUTAN TANAMAN <i>Acacia mangium</i> Willd. [Pathological Rotation of <i>Acacia mangium</i> Willd. Forest Stand] Simon Taka Nuhamara, Soetrisno Hadi, Endang Suhendang, Maggy T Suhartono, Wasrin Syafii dan Achmad.....	59
KEANEKARAGAMAN FLORA CAGAR ALAM NUSA BARONG, JEMBER - JAWA TIMUR [Floral Diversity of Nusa Barong Nature Reserve, Jember - East Java] Tukirin Partomihardjo dan Ismail.....	67
KARAKTERISASI 17 FAMILI IKAN NILA (<i>Oreochromis niloticus</i>) GENERASI KE TIGA (G-3) BERDASARKAN METODE TRUSS MORFOMETRIKS [Characterization of 17 Families of Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) Third Generation (G-3) Based on Truss Morphometrics] Nuryadi, Otong Zenal Arifin, Rudhy Gustiano dan Mulyasari.....	81

INDUKSI KALUS DAN REGENERASI TUNAS PULAI PANDAK (*Rauwolfia serpentina* L.)
[Callus Induction and Shoot Regeneration of Pulau pandak (*Rauwolfia serpentina* L.)]
Rossa Yunita dan Endang Gati Lestari.....91

POTENSI ANTIBAKTERIA EKSTRAK DAN FRAKSI LIBO (*Piper mlnlatum* BL.)
[Antibacterial Potential of Extract and Fraction of Libo (*Piper mlnlatum* BL.)]
Sumarnie H Priyono.....99

TOLERANSI SENGON BUTO (*Enterolobium cyclocarpum* Griseb) YANG DITANAM
PADA MEDIA LIMBAH TAILING TERCEMAR SIANIDA DENGAN PERLAKUAN PUPUK
[Tolerance of Sengon buto (*Enterolobium cyclocarpum* Griseb) Grown on Cyanide
Contaminated Tailing Media with Fertilizer Application]
Fauzia Syarif.....105

KOMUNIKASI PENDEK

MENGESTIMASI NILAI KERUSAKAN TUMBUHAN INANG AKIBAT PEMARASITAN
BENALU
[Estimating the Destruction of Host Plant caused by Mistletoe Parasitizing]
Sunaryo.....111

KERUSAKAN DINDING SEL *Escherichia coli* K1.1 OLEH MINYAK ATSIRI
TEMU KUNCI (*Kaempferiapandurata*)
[Cell Wall Disruption of *Escherichia coli* K1.1 by Temu Kunci
{*Kaempferiapandurata*} Essential Oil]

Miksusanti^{1,1*}, Betty Sri Laksmi Jennie², Bambang Ponco³ dan Gatot Trimulyadi⁴

¹Fakultas MIPA-Universitas Sriwijaya, Palembang, ²Program Studi Ilmu Pangan-IPB,

³ Fakultas Kedokteran Hewan-IPB dan ⁴Pusat Penelitian Teknologi Radiasi-BATAN

*E-mail: ati_mik@yahoo.com

ABSTRACT

Antibacterial activity of temu kunci (*Kaempferiapandurata*) essential oil against *Escherichia coli* K1.1 was analyzed. Activity of antibacterial essential oil was analyzed through its ability to leak the *Escherichia coli* K1.1 cell wall and altering it. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of temu kunci essential oil is 0.11% (v/v). Further studies were conducted using the concentration of 1 MIC and 2 MIC. Leakage phenomena were monitored with atomic adsorption spectrometry (AAS), and ultraviolet spectrophotometry (UV). Alteration of cell wall was analyzed with scanning electron microscopy (SEM). The optical density values observed by UV spectrophotometer for protein and nucleic acid leakage were 0.3813-0.6573 at 280 nm and 0.2186-0.5603 at 260 nm. The result showed that *K. pandurata* essential oil could leak the inorganic ion Ca^{+2} 17-53%, and K^{+1} 9-43% from the bacteria and alter the cell wall of the bacteria.

Kata kunci: *Escherichia coli* K1.1, temu kunci, *Kaempferia pandurata*, kebocoran ion, perubahan dinding sel, protein, asam nukleat.

PENDAHULUAN

Reaksi antara senyawa minyak atsiri dengan komponen pada dinding sel bakteri dapat menyebabkan kerusakan pada sel. Jenis senyawa dalam minyak atsiri dan komponen pembentuk dinding sel sangat mempengaruhi efektivitas minyak atsiri tersebut dalam merusak dinding sel suatu bakteri. Struktur dinding sel bakteri gram negatif *Escherichia coli* terdiri dari tiga lapisan yaitu membran sitoplasma, membran luar, dan lapisan di antara keduanya yaitu lapisan tipis peptidoglikan. Membran luar sel terdiri dari lipopolisakarida, fosfolipid dan lipoprotein. Kekompakan lapisan lipopolisakarida (LPS) distabilkan oleh interaksinya dengan ion Ca^{+2} serta ion divalen lainnya. Kestabilan permeabilitas membran sel bakteri ini juga dipengaruhi oleh konsentrasi ion K^{+1} pada cairan sitoplasma. (Madigan *et al.*, 2003).

Membran sitoplasma berperan dalam mempertahankan keutuhan struktur sel dan berfungsi dalam transport nutrient secara selektif ke dalam sel. Membran juga tempat terletaknya enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis dinding sel. Bila membran rusak, maka fungsi sel akan terganggu yang mengakibatkan pertumbuhan sel terhambat atau menjadi mati (Fardiaz, 1992; Brookes *et al.*, 1996). Agen

fisik maupun senyawa kimia pada organisme prokariot dapat menyebabkan kematian dengan rusaknya membran sel bakteri (Russel, 1984).

Efek senyawa antibakteri pada morfologi dan ultrastuktural sel bakteri dapat dikelompokkan menurut target di mana perubahan sel terjadi. Misalnya antibiotik, P-laktam, polimiksin akan menyebabkan perubahan pada membran plasma, kloramfenikol, tetrasiklin dan aminoglikosidase menyebabkan perubahan pada ribosom (Gammel dan Lorian, 1996).

Minyak atsiri umumnya mengandung molekul-molekul yang dapat bertindak sebagai antibakteri. Berdasarkan penelitian Xianfei *et al.* (2006), minyak atsiri dari *Chaenomeles speciosa* yang mengandung molekul benzaldehid, linalol, simen, borneol dan osimen dapat menghambat *E. coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) dan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Kemampuan minyak atsiri tersebut juga telah dibuktikan dalam menghambat pertumbuhan jamur. Menurut Rasooli *et al.* (2005), komponen minyak atsiri *thymus*, dapat menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes*. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa komponen minyak atsiri mampu merusak dinding sel

L. monocytogenes (analisa dengan SEM) dan merusak gradien proton dalam cairan sitoplasma bakteri tersebut. Sifat antilisteria *thymus* lebih kuat dari efek "electric shocks" yang dikombinasi dengan nisin. Minyak atsiri ini dapat mencegah pertumbuhan *L. monocytogenes* dalam lemari pendingin.

Salehi et al. (2004) juga menemukan bahwa minyak atsiri dari *Ziziphora clinopodioides* mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri yang tergolong gram positif dan gram negatif. Kemampuan minyak atsiri dari tanaman ini sebagai antibakteri tergolong rendah.

Minyak atsiri adalah metabolit sekunder dari tanaman yang terdiri dari senyawa-senyawa yang mempunyai karakteristik menimbulkan aroma atau flavor. Analisis minyak atsiri menunjukkan bahwa dari sekian banyak komponen penyusunnya, terpenoid adalah yang paling melimpah dan berada dalam bentuk monoterpen, seskuiterpen serta turunan masing-masing senyawa tersebut. Turunan monoterpen, seskuiterpen serta komponen non isoprennya umumnya berada dalam bentuk teroksigenasi berupa gugus keton, epoksi dan hidroksil (Skocibusic et al., 2006). Minyak atsiri *Thymus* mengandung komponen kimia p-simen, y-terpinen, karvakrol dan timol (Ultee et al., 2002). Senyawa-senyawa tersebut telah dilaporkan memiliki sifat antibakteri, baik digunakan dalam bentuk campuran utuh sebagai minyak atsiri maupun dalam bentuk senyawa tunggal (Delaquis et al., 2002; Carson et al., 2002; Trombetta et al., 2005; Rasooli et al., 2006).

Informasi tentang mekanisme aksi antibakteri minyak atsiri temu kunci (*Kaempferia pandurata* - Zingiberaceae) terhadap *E. coli* K1.1 belum pernah dipublikasikan. Dalam penelitian ini akan dikaji pengaruh minyak atsiri temu kunci dari daerah Yogyakarta terhadap sel bakteri *E. coli* K1.1. Penelitian akan difokuskan pada kerusakan sel bakteri yang dianalisis dengan *scanning electron microscopy* (SEM), spektrometer serapan atom (AAS) dan spektrofotometer UV.

BAHAN DAN METODA

Isolasi dan identifikasi kandungan kimia minyak atsiri temu kunci

Rimpang temu kunci (diperoleh dari Pasar

Klewer, Yogyakarta), diiris tipis dan disuling dengan menggunakan uap air yang panas, dengan alat destilasi. Penyulingan dilakukan selama 8 jam. Setelah minyak atsiri keluar maka air yang masih terbawa bersama minyak atsiri dikeringkan dengan penambahan natrium sulfat anhidrat. Rendemen minyak atsiri dihitung sebagai berat minyak atsiri perberat sampel x 100%.

Penentuan komponen kimia dalam minyak atsiri temu kunci dengan GC-MS

Penentuan kandungan minyak atsiri menggunakan alat Gas Kromatografi HP 5890 serie II, yang dilengkapi dengan detektor FID yang terhubung dengan kolom kapiler HP-5 (25m x 0,2 mm, ketebalan film 0,33 µm) menggunakan hidrogen sebagai gas pembawa (1,0 mL/menit). Temperatur injektor adalah 250°C, program temperatur oven kolom adalah 60-240°C dengan 3°C/menit. Detektor FID dioperasikan pada 280°C. Pengoperasian GC/MS dengan menggandengkan Agilent 59873 MSd dengan Agilent 6890 kromatografi gas, menggunakan helium sebagai gas pembawa. Identifikasi kandungan senyawa minyak atsiri dengan menggunakan perbandingan pola fragmentasi (*retention time and mass spectra*) yang dihubungkan dengan data Wiley 229 dan NIST 62. Persentase komponen yang diperoleh merupakan persentase relatif.

Penentuan MIC dengan metode pengenceran (*microdillution broth*) (Cox et al., 2000)

Penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan berdasarkan metoda pengenceran (*micro dillution broth*). Bakteri uji dalam bentuk *nutrient broth* yang mengandung 0,1 % tween 80 (10⁶CFU/mL), diambil 1 mL dan dicampur dengan 9 mL *nutrient broth* (NB) yang telah mengandung minyak atsiri 1%. Dari tabung tersebut dibuat sederetan pengenceran (10¹ CU/mL - 10⁷CFU/mL) dengan konsentrasi minyak atsiri 0,003%-0,3%, dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Masing-masing tabung yang memiliki konsentrasi bakteri uji dan minyak atsiri tertentu *di-plating* dan diinkubasi pada suhu 37°C. Semua pengerjaan dibuat tiga kali ulangan. Penentuan konsentrasi efektif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri diuji dengan penetapan MIC. Nilai MIC adalah konsentrasi minyak atsiri terendah yang

dapat menurunkan viabilitas inokulum >90% setelah diinkubasi selama 24 jam.

Analisis kebocoran protein dan asam nukleat (Carson *et al.*, 2002)

Suspensi bakteri uji yang telah ditumbuhkan selama 24 jam dalam media *nutrien broth* sebanyak 10 mL diambil, ditambah 0,5 mL tween 80 sehingga konsentrasinya menjadi 0,1% dalam larutan bakteri uji. Larutan bakteri uji kemudian disentrifus dingin dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Filtrat dibuang lalu pelet dalam tabung dicuci dengan 0,1% buffer fosfat pH 7,0 sebanyak 2 kali, kemudian disuspensikan dalam 10 mL buffer fosfat pH 7,0. Selanjutnya ditambahkan minyak atsiri temu kunci dengan konsentrasi 1 MIC, dan 2 MIC serta kontrol, diinkubasi dalam inkubator goyang selama 24 jam. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, lalu disaring dengan tujuan untuk memisahkan supernatan dari sel. Cairan supernatan diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV/VIS Shimadzu (1600).

Kebocoran ion-ion logam (Cox *et al.*, 2000)

Untuk analisa kebocoran ion-ion diukur dalam bentuk ion Ca^{2+} dan K^{+} yang keluar dari membran sel bakteri akibat perlakuan dengan minyak atsiri *K.pctndurata*. Analisis kebocoran ion dilakukan pada pelet bakteri yang dipersiapkan seperti pada pengukuran kebocoran protein dan asam nukleat. Kebocoran dinyatakan dengan terukurnya ion—ion (Ca^{2+} dan K^{+}) yang terdapat pada bakteri uji setelah dikontakkan dengan minyak atsiri temu kunci dengan konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC. Kebocoran ion-ion K^{+} dan Ca^{2+} dideteksi dengan menggunakan AAS Shimadzu. Larutan sel hasil kontak dengan minyak atsiri temu kunci diambil untuk diukur kandungan ion-ionnya.

Analisis kerusakan dinding sel dengan Scanning Electron Microscopy (SEM) (Shi dan Xuhua, 2003)

Suspensi sel dimasukkan dalam 0,1% buffer fosfat yang mengandung 0,15% tween 80. Suspensi tersebut diberi perlakuan 1 MIC dan 2 MIC minyak atsiri dan diinkubasi selama 24 jam pada *shaker* 150 rpm suhu. Untuk kontrol suspensi sel dalam buffer

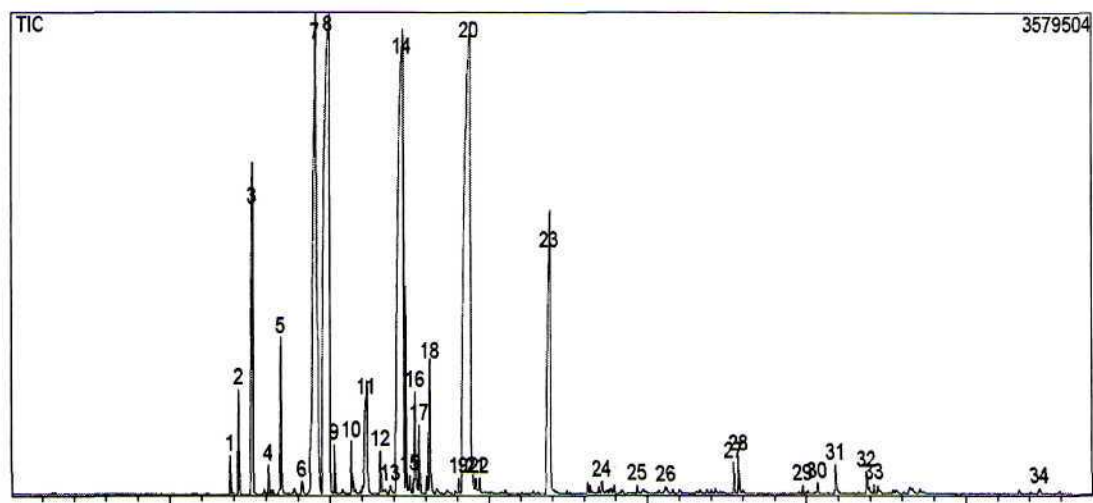
fosfat yang mengandung tween 80 tidak diberi minyak atsiri. Pellet difiksasi dengan glutaraldehid 2% selama 2 jam, lalu ditambah buffer *cocodilate* 0,2M pH 7,2 selama 20 menit. Kemudian ditambah osmium tetraoksida 1% dalam buffer *cocodilate* dibiarkan dalam *refrigerator* selama 1 jam. Kemudian dikeringkan berturut-turut dengan alkohol 70%, alkohol 80%, dan alkohol 96% masing-masing selama 10 menit. Pellet sel bakteri ditambah butanol, dan dibuat suspensi. Satu ose suspensi diletakkan di atas potongan bujur sangkar *cover slip* yang telah direkatkan pada *stub* aluminium dan dibekukan, kemudian dikeringkan dengan *freeze drier* selama 4 jam. Suspensi yang telah mengering *di-cover slip* kemudian dilapisi dengan emas melalui proses vakum (6-7 Pa) selama 20 menit dan diamati dengan alat *scanning electron microscopy* JEOL6300.

HASIL

Isolasi dan identifikasi kandungan kimia minyak atsiri temu kunci

Rendemen minyak atsiri yang dihasilkan adalah 4%v/b. Gambar 1 menunjukkan kromatogram GC-MS minyak atsiri temu kunci asal Yogyakarta. Dari kromatogram ini terlihat bahwa komponen kimia minyak yang terdeteksi pada kondisi analisis adalah 34. Ada 10 komponen kimia dalam minyak atsiri temu kunci yang merupakan komponen mayor (> 1%) yaitu kampen (3), beta-mirsen (5), eukaliptol (7), osimen (8), L-linalool (11), kamfor (14), borneol (16), 1-alpha-terpineol (18), geraniol (20) dan metil sinamat (23).

Kandungan komponen kimia yang <1% digolongkan sebagai komponen minor (*trace*) dalam minyak atsiri. Komponen kimia minor dalam minyak atsiri temu kunci ini adalah trimetiltrisiklil (1), pipen (2), sabinen (4), alfa-terpinen (6), beta-terpinen (9), terpinolen (10), beta-osimen (12), oktatien (13), isobomil alkohol (15), terpinen (17), fenil-metil propanoat (19), sitral (21), metil benzo propanoat (22), asam isobutirat (24), beta-hidroksi silen (25), zerumbon (26), silen (27), metil heksadekanoat (28), dan farnasen (29), metil palmitat (30), asam heksadekanoat (31), bisiklo pentena (32), bisiklo trimetil fenil (33) dan farnesol (34).



Gambar 1. Kromatogram GC-MS minyak atsiri temu kunci asal Yogyakarta

Nilai MIC minyak atsiri temu kunci terhadap *E. coli* K1.1

Nilai MIC adalah konsentrasi minyak atsiri terendah yang dapat menurunkan viabilitas inokulum >90% setelah diinkubasi selama 24 jam (Cosentino *et al.*, 1999). Hasil pengujian dengan berbagai konsentrasi minyak atsiri dalam pelarut etanol (90%), maka didapatkan bahwa nilai MIC minyak atsiri temu kunci asal Yogyakarta terhadap *E. coli* K1.1 adalah 0,11 % v/v. Untuk analisis aktivitas mekanisme antibakteri minyak ini, digunakan konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC.

Kebocoran ion sel bakteri *E. coli* K1.1 oleh minyak atsiri temu kunci

E. coli K1.1 adalah sel bakteri gram negatif yang mempunyai lapisan peptidoglikan tipis. Hal ini akan mempermudah molekul minyak atsiri untuk masuk ke dalam sel bakteri. Dari kurva Gambar 2, terlihat bahwa minyak atsiri temu kunci dapat menyebabkan terlepasnya ion Ca^{+2} dan K^{+} dari sel-sel bakteri *E. coli* K1.1. Sejalan dengan dengan bertambahnya konsentrasi minyak atsiri yang digunakan, maka akan semakin banyak jumlah ion Ca^{+2} , K^{+} dan protein serta asam nukleat yang keluar dari sel bakteri *E. coli* K1.1 seperti terlihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.

Kebocoran asam nukleat /protein sel bakteri *E. coli* K1.1 oleh minyak atsiri temu kunci

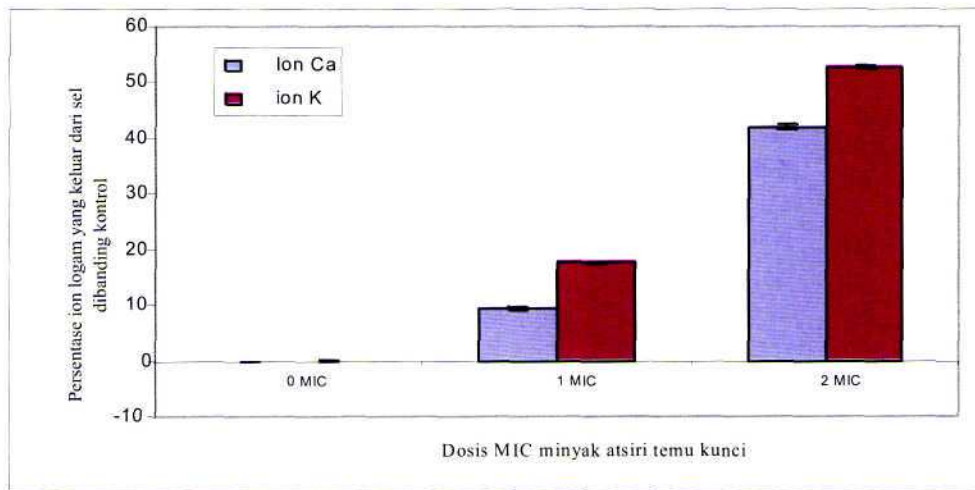
Senyawa-senyawa dalam minyak atsiri juga

telah menyebabkan terlepasnya protein dan asam nukleat dari sel tersebut. Terlepasnya material-material sel akibat kerusakan sel dapat dideteksi dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Senyawa-senyawa yang memberikan serapan pada panjang gelombang 260 nm adalah RNA dan DNA, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm diidentifikasi sebagai protein (Gilbert, 1984). Menurut Skoog (1985) yang dikutip oleh Park *et al.* (2003), pada panjang gelombang 260 nm dapat dideteksi purin, pirimidin dan ribonukleotida, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm dapat dideteksi asam amino seperti tirosin dan triptofan.

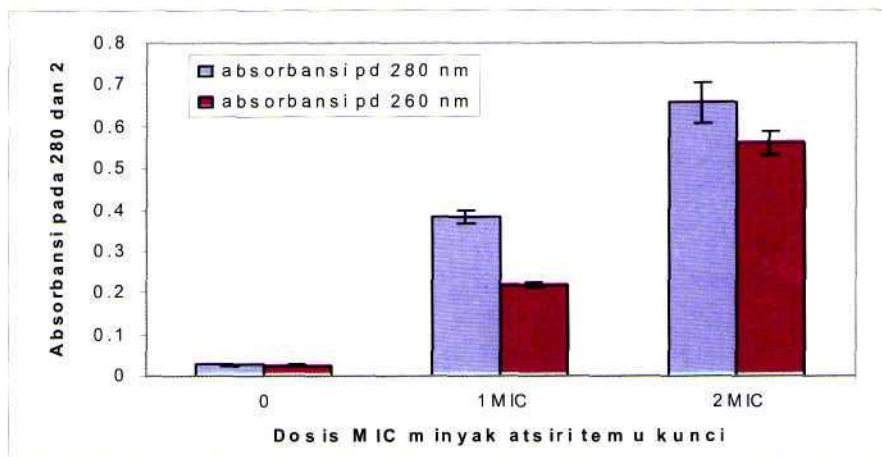
Perubahan dinding sel bakteri *E. coli* K1.1 oleh minyak atsiri temu kunci

Perubahan yang terjadi pada *E. coli* K1. 1 hasil perlakuan dengan minyak atsiri pada 1 MIC dan 2 MIC dapat dilihat pada Foto 1.b dan Foto 1.x. Terlihat perbedaan yang sangat signifikan antara sel kontrol (yang tidak diberi perlakuan/ Foto 1.a) dengan sel hasil perlakuan.

Pada Foto 1.b terlihat dinding sel bakteri menjadi menebal dan ada lekukan kasar pada kedua ujung sel yang merepresentasikan kerusakan/kebocoran sel. Foto 1.b dan Foto 1.c juga menunjukkan pembelahan sel yang tidak sempurna. Perlakuan dengan 1 MIC dan 2 MIC minyak atsiri menyebabkan terjadi tonjolan-tonjolan yang acak pada kedua bagian sel



Gambar 2. Tingkat kebocoran ion-ion dari *E.coli* K 1.1 pada berbagai dosis minyak atsiri temu kunci



Gambar 3. Tingkat kebocoran protein dan asam nukleat dari *E. coli* K 1.1 pada berbagai dosis minyak atsiri temu kunci

yang mengganggu pembelahannya.

PEMBAHASAN

Secara struktur kimianya kandungan komponen terbanyak (mayor) minyak atsiri temu kunci asal Yogyakarta adalah monoterpen hidrokarbon (mirsen, osimen), monoterpen teroksigenasi (kamphor, sineol, linalol, borneol, terpineol, geraniol), dan turunan fenil propanoat (metil sinamat, fenil metil propanoat). Di antara monoterpen teroksigenasi tersebut, sineol, linalol, borneol, terpineol dan geraniol adalah senyawa monoterpen yang mengandung gugus hidroksil (alkohol). Gugus ini dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil senyawa lainnya seperti alkohol. Adanya

sebagian besar senyawa monoterpen dengan gugus ini membuat minyak atsiri tersebut bersifat semi polar, sehingga tidak larut dalam air, tetapi larut baik dalam alkohol (Ruberto *et al.*, 2000). Sitral termasuk kelompok asam lemah, yang dapat melepaskan protonnya (FT) dalam keadaan sedikit H^+ . Geraniol juga merupakan senyawa yang dapat bertindak sebagai asam yang sangat lemah, **hal ini** terjadi bila ikatan rangkap dalam senyawa tersebut berkonyugasi (Fessenden dan Fessenden, 1997).

Senyawa aldehid dan alkohol dalam minyak atsiri merupakan senyawa semi polar yang bersifat hidrofilik dan dapat masuk melewati membran luar sel. Hal ini disebabkan membran luar sel *E. coli* K1.1 diselubungi oleh lipopolisakarida (LPS) yang bersifat

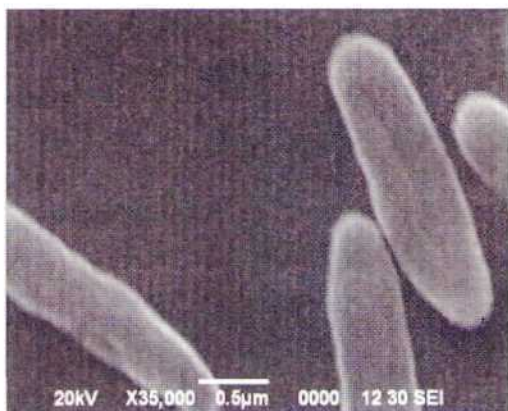


Foto 1.a. Morfologi sel *E.coli* K1.1 kontrol



Foto1.b. Morfologi self.coli K1.1 setelah perlakuan dengan 1 MIC minyak atsiri

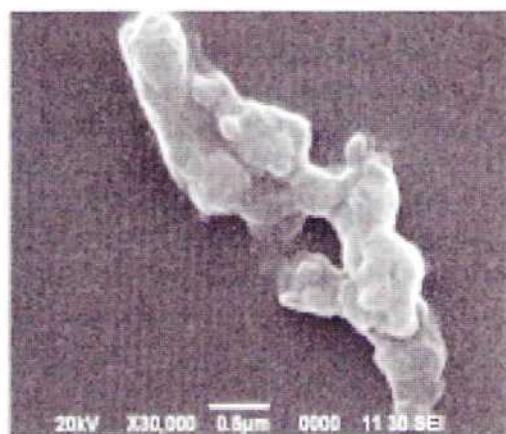


Foto 1.e. Morfologi self.coli K1.1 setelah perlakuan dengan 2 MIC minyak atsiri

semi polar (hidrofilik). Molekul ini dapat masuk dengan bantuan senyawa-senyawa non-polar (hidrofobik) seperti monoterpen hidrokarbon siklik ke bagian dalam membran sel, berinteraksi dengan senyawa-senyawa penting intraseluler sel, sehingga kerja normal sel terganggu (Trombetta *et al.*, 2005). Senyawa monoterpen yang teroksigenasi dalam bentuk monoterpen hidrokarbon siklik teroksigenasi dapat menyebabkan gangguan pada bagian lipid dari membran luar sel, menyebabkan perubahan sifat permeabilitas membran plasma dan kebocoran material intraseluler dari membran. Hal ini disebabkan kesamaan sifat non polar (hidrofobik) dari monoterpen hidrokarbon siklik dan bagian fosfolipid dari membran sel. Senyawa monoterpen hidrokarbon siklik yang merupakan salah satu komponen penyusun minyak atsiri, telah dibuktikan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* (Cox *et al*, 2000).

Dari data kebocoran ion-ion serta protein/asam nukleat menunjukkan telah terjadi kerusakan yang permanen dan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri. Kebanyakan zat-zat antibakteri yang bekerja merusak membran sitoplasma mempunyai kemampuan mengeluarkan material-material sel seperti ion, asam nukleat dan protein. Contohnya adalah pentil alkohol (Corre *et al*, 1985), dan α -pinene (Andrews *et al.*, 1980). Kebocoran sel bakteri dapat disebabkan karena rusaknya kekompakan lipopolisakarida (LPS) sebagai komponen penyusun membran luar sel, serta larutnya komponen-komponen yang berikatan secara hidrofilik oleh pengaruh zat antibakteri komponen kimia minyak atsiri yang bersifat hidrofilik. Hal ini dapat meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga memungkinkan masuknya komponen kimia minyak atsiri secara keseluruhan ke dalam sel dan menyebabkan keluarnya ion, asam nukleat serta protein dari dalam sel yang menyebabkan kerusakan sel (Ingram, 1981).

Dari foto SEM terlihat bahwa sel *E. coli* K1.1 normal berbentuk batang yang mulus dan cenderung simetris. Perlakuan dengan minyak atsiri 1 MIC menyebabkan *E.coli* K1.1 mengalami perubahan dibanding sel *E.coli* K1.1 kontrol. Permukaan sel *E. coli* K1.1 menjadi mengerut, kasar dan terdapat tonjolan-tonjolan kecil akibat tidak ratanya dinding sel.

Sel tersebut memanjang dengan tidak teratur. Proses ini disebabkan karena pembelahan sel tidak dapat terjadi dengan sempurna akibat perlakuan dengan minyak atsiri temu kunci. Kerusakan yang terjadi pada dinding sel bagian ujung sel kemungkinan karena proses sintesis peptidoglikan sel yang terganggu iRasooliefa/,2006).

Dengan pemberian minyak atsiri temu kunci 2 MIC, terlihat telah terjadi kerusakan yang lebih berat pada sel. Terjadi tonjolan-tonjolan di sekujur sel. Menurut Gilbert (1984) terbentuknya tonjolan-tonjolan kecil pada sel bakteri disebabkan ketidakmampuan peptidoglikan sel yang rusak oleh senyawa antibakteri menahan tekanan intraseluler yang tinggi, sehingga sitoplasma dan membran sitoplasma keluar dan tonjolan ini biasanya muncul pada daerah-daerah yang dilemahkan oleh senyawa antibakteri. Terbentuknya tonjolan juga merupakan tanda terganggunya proses biosintesis dinding sel yang umumnya terjadi pada konsentrasi zat antibakteri pada nilai MIC. Sel yang mengalami kerusakan berat tersebut biasanya disebut sebagai *ghost cell*. Sel *ghost* ini biasanya hanya terdiri dari kulit sel bagian luar tapi tidak memiliki peptidoglikan. Terbentuknya sel *ghost* ini diduga karena terjadi gangguan terhadap sintesis dinding sel dan berubahnya permeabilitas sel yang pada akhirnya menyebabkan terlepasnya material sel keluar. Hal ini didukung dengan hasil analisis kebocoran sel baik kebocoran ion-ion, maupun kebocoran protein serta asam nukleat sesuai data di atas (Gambar 2 dan Gambar 3). Dalam hal ini sel telah mengalami kerusakan yang berat (McGuire dan Conrad, 2000).

Sinergis terjadi antara komponen kimia minyak atsiri yang hidrofilik dengan komponen yang hidrofobik (Delaquis *etal.*, 2002). Senyawa monoterpen dan turunan fenil propanoat yang bersifat hidrofilik dapat berinteraksi dengan LPS. Komponen kimia minyak atsiri yang hidrofobik berinteraksi dengan fosfolipid dan lipoprotein pada membran luar. Komponen kimia yang hidrofobik selanjutnya juga berinteraksi dengan peptidoglikan yang hidrofobik. Proses ini mengganggu permeabilitas membran, sehingga memudahkan semua komponen kimia minyak atsiri masuk ke membran sitoplasma. Molekul kimia minyak atsiri terakumulasi dalam membran sitoplasma.

Akumulasi ini menyebabkan membran sel mengalami *swelling*. Proses *swelling* ini menyebabkan permeabilitas dan fluiditas membran berubah (Sikkema *et al.*, 1994). Senyawa-senyawa hidrokarbon yang mengandung gugus hidroksil yang bersifat asam lemah dalam minyak atsiri dapat bertindak sebagai *carrier* transmembran dari kation monovalen dengan mengeluarkan kation monovalen dari membran dan menukarnya dengan proton. Proses ini mengganggu kestabilan membran dan menurunkan potensial membran. Nilai pH dalam membran akan menurun, dan merusak kerja normal enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme sel termasuk enzim yang berperan dalam pembentukan dinding sel (Ultee *et al.*, 2002). Hal ini dapat menyebabkan pembentukan dinding sel terganggu; fenomena ini dapat dilihat pada Foto 1,b dan Foto 1.e.

KESIMPULAN

Minyak atsiri temu kunci (*Kaempferia pandurata*) mempunyai aktivitas antibakteri yang sangat baik terhadap *E.coli* K1.1. Minyak atsiri ini dapat merusak dinding sel bakteri dan menyebabkan terlepasnya material sel, baik material anorganik (ion-ion) maupun material organik (protein dan asam nukleat). Tingkat kerusakan dinding sel dan jumlah protein, asam nukleat serta ion-ion yang dilepaskan dipengaruhi oleh konsentrasi minyak atsiri.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memisahkan masing-masing senyawa penyusun minyak atsiri temu kunci dan menentukan aktivitas antibakteri dari masing-masing senyawa tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrews RE, LW Parks and KD Spence. 1980. Some effects of mono terpenes on certain microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 301-304.
- Brookes P, DJ Harris and RB Longmore. 1996. Isolation of minor lupin alkaloids. A simple procedure for the isolation of *angustifoline* from *Lupinus angustifolius* (cv. Fest) seeds, with application to other lupin alkaloids. *J. Agric. FoodChem.* 44 (8), 2129-2133.
- Cosentino S, CIG Tuberoso, B Pisano, M Satta, V Masca, E Arzedi and F Palmas, 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Tymus* essential oils. *Letter in Applied Microbiology* 29,130-135.
- Corre J, JJ Lucchini, GM Mercier and A.Cremieux.

1990. Antibacterial activity of the phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Res. Microbiol.* **141**, 483-497.
- Carson CF, JM Brian dan TV Riley. 2002. Mechanism of action of tea tree oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lyses, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 6,1914-1920.
- Cox SD, CM Mann, JL Markham, HC Bell, JE Gustafson, JR Warmington and Wyllie SG 2000. The mode of antibacterial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. of Appl. Microbiology* 88, 170-175.
- Delaquis P, J Stanich, K Girarad and G Mazza. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander, and eucalyptus essential oils. *International. J. Food Microbiology* 74,101-109.
- Fessenden RJ dan JS Fessenden. 1997. *Kimia Organik*, Edisi 3. Erlangga Jakarta
- Fardiaz S. 1992. *Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut*. PAU Pangan dan Gizi - Institut Pertanian Bogor.
- Gilbert P. 1984. The Revival of Micro-organism Sublethally Injured by Chemical Inhibitors. In: *The Revival of Injured Microbes*. MJE Andrew and AD Russel (Eds). Academic Press. London.
- Gammel CG and V Lorian. 1996.. Effect of Low Concentration of Antibiotics on Bacterial Ultrastructure, Virulence and Susceptibility to Immunodefence: Clinical Significance. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. V Lorian (Ed.). Fourth ed. Williams & Wilkins, London.
- Ingram LO. 1981.Mechanisms of lysis of *E.coli* by ethanol and other chaotropoc agents. *J. Bacteriol.* **146(1)**, 331-335.
- McGuire MD and RS Conrad. 2000. Morphological and biochemical alteration in *S.epidermis* stepwise adapted to vancomycin resistance. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* Vol. 80.
- Madigan MT, JM Martinko and J Parker. 2003. *Brook Biology of Microorganisms*. Tenth Edition, Southern Illionis University, Carbondale.
- Park SJ, HW Park and J Park. 2003. Inactivation kinetics of food poisoning microorganisms by carbon dioxide and high hydrostatic pressure. *J. FoodSci.* **68 (3)**, 976-981.
- Rasooli I, MB Razaei and A Allameh. 2006. Ultratructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. Journal of Infectious Diseases* **10**,236-241.
- Ruberto G, dan Baratta MT, 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* **69**, 167-174.
- Russel AD. 1984. Potential Sites of Damage in Microorganisms Exposed to Chemical or Physical Agent. In: *The Revival of Injured Microbes*. MHE Andrew and AD Russel (Eds.). Academic Press. London.
- Salehi P, A Saholi, F Eftekhari, S Nejad-Ebrahimi and M Yousefzadi. 2005. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extract of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (Boiss) Rech. from Iran. *J. Agric Food Chem.* **28**, 52 -56.
- Shi Bihong and Xuhua Xia. 2003. Morphological changes of *Psedomonas psedoalcaligenes* in response to temperature selection. *Current Microbiology* 46,120-123.
- Sikkema J, AM Jan, Bont de, B Poolman. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* **269**,8022-8028.
- Skocibusic M, N Bezic and A Dunkic. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chem.* **96**, 20-28.
- Trombetta D, A Saija, G Bisignano, S Arena, S Caruso, G Mazzanti, N Ucella and F Castelli. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, 49(6), 2474-2478.
- Ultee A, MHJ Bennik and R Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 4,1561-1568.
- Xianfei X, C Xiaoqiang, Z Shunying and Z Goulin. 2006. Chemical composition and cntimicrobial activity of essential oils of *chaenomeles speciosa* from China *Food Chemistry*2,15-19.