

Karakterisasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Anti Jamur Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap *Aspergillus*

Rini Yanti^{1*}, Pudji Wulandari¹, Yudi Pranoto¹, Muhammad Nur Cahyanto¹

¹Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian
Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

*Email: riniyanti@ugm.ac.id

ABSTRACT

The objective of the work was to observe the physical properties, identify the components, and determine the antifungal activity of essential oil from lime leaves. Essential oil was extracted from lime leaves by water-steam distillation and determined its physical properties such as specific gravity, refractive index, and solubility in alcohol. The components of the oil were analyzed using GC-MS. Antimicrobial activity was evaluated against five species of *Aspergillus*, i.e.: *A. niger*, *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. Parasiticus*, and *A. candidus*. Spores of the fungi were inoculated into plates of potato dextrose agar supplemented with lime leave essential oil at different concentration and incubate at 30°C for 7 days. Development of colonies was observed during the incubation. The essential oil from lime leaves had specific gravity of 0.8601, refractive index of 1.4523, and soluble in 2 volume and more 90% alcohol. The main compound in the essential oil was citronellal (87.9%). The oil also contained linalool (3.96%), transcaryophylene (2.17%), citronellil acetat (1.79%), and sabinene (1.78%). The oil showed antimicrobial activity against these five species of *Aspergillus*.

Keywords: Lime leaves, essential oil, antifungal, *Aspergillus*

PENDAHULUAN

Dalam beberapa dekade terakhir, penelitian tentang produk alami untuk menggantikan aditif / pengawet sintesis di industri makanan semakin intensif dilaksanakan. Penerapan bahan kimia seperti kelompok benzimidazol, serta penghambat biosintesis hidrokarbon aromatik memiliki risiko residual sebagai agen karsinogenik bila digunakan dalam konsentrasi yang relatif tinggi. Zat alami seperti minyak esensial muncul sebagai senyawa yang menjanjikan dan efektif untuk melindungi makanan. Beberapa minyak esensial telah diklasifikasikan sebagai GRAS (Generally Recognized as Safe) dan menunjukkan aktivitas anti jamur dan antibakteri dari berbagai mikroorganisme pada penelitian

sebelumnya (Tripathiet *et al.*, 1985). Di Indonesia, ada banyak jenis tanaman yang bisa diekstraksi atau distilasi untuk menghasilkan minyak esensial.

Jeruk purut (*Citrus hystrix*) adalah tanaman yang banyak ditanam di Indonesia. Daunnya digunakan sebagai *flavorant* untuk memasak. Namun, penggunaan minyak esensial daun ini di Indonesia masih terbatas. Penyelidikan tentang karakterisasi fisik dan komposisi kimiawi diperlukan untuk standarisasi minyak ini. Penerapan minyak dalam mencegah pertumbuhan jamur, yang berdampak negatif pada makanan juga perlu diselidiki.

Penelitian sebelumnya terhadap daun *C. hystrix* menunjukkan bahwa ekstrak kasar dari daun juga menunjukkan promotor anti tumor (Murakami *et al.*,

1995; Tiwawech et al., 2000), sitotoksik (Onget et al., 2009), anti bakteri (Wannissornet Al., 2005), dan aktivitas anti-oksidan (Hutadilok-Towatana et al., 2006; Wong et al., 2006).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi komponen minyak esensial daun jeruk purut dan mengevaluasi aktivitas antijamur ke *Aspergillus* yang berbeda.

METODE PENELITIAN

a. Bahan dan Alat

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.) yang diperoleh dari pasar Imogiri di kabupaten Bantul, propinsi Yogyakarta. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tween 80, sodium sulfat anhidrat (Na_2SO_4 anhidrat), aquades, dan etanol 95%, alkohol netral, alkohol-KOH 0,1 N, indikator pp, alkohol-KOH 0,4 N, dan asam sulfat 0,25 N. Media yang digunakan untuk penumbuhan jamur adalah PDA (Potato Dextrose Agar). Komposisi media PDA adalah 200 gram kentang, 15 gram agar, 20 gram glukosa, dan 1 liter aquades. Sedangkan isolat jamur yang digunakan adalah *Aspergillus niger*, *A. tamaari*, *A.candidus*, *A flavus* FNCC 6133 dan *Aspergillus parasiticus* FNCC 6033, yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi, UGM.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah GCMS-QP2010S Shimadzu dan peralatan penunjang lainnya.

b. Metode

Penelitian ini meliputi 3 tahapan utama yakni preparasi minyak atsiri, penentuan sifat kimia dan fisik minyak atsiri dan pengujian uji aktivitas penghambatan minyak atsiri terhadap *Aspergillus niger*, *A. tamaari*, *A.candidus*,

A. flavus dan *Aspergillus parasiticus* secara *in vitro*.

Minyak atsiri diperoleh melalui 2 tahapan yaitu proses pengeringan daun dan distilasi minyak atsiri. Daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.) segar dikeringkan dalam *cabinet dryer* pada suhu 36-40°C selama 24 jam hingga kadar air 15,16 % untuk daun jeruk purut. Pengeringan dilakukan dengan cara menghamparkan daun dalam rak-rak pengeringan.

Analisa sifat fisik yang terkait dengan mutu minyak atsiri meliputi bobot jenis, indeks refraksi, kelarutan dalam alkohol, angka asam, dan angka ester. Penentuan bobot jenis dilakukan berdasarkan metode yang tercantum dalam Guenther (1987), indeks refraksi dilakukan berdasarkan metode yang tercantum dalam Guenther (1987), angka asam dilakukan berdasarkan metode yang tercantum dalam Sudarmadji (2003). Kelarutan dalam alkohol dilakukan berdasarkan metode yang tercantum dalam Guenther (1987)

Analisis Komponen Minyak Atsiri

Identifikasi komponen kimia penyusun minyak atsiri (*Citrus hystrix* D.C.) dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography - Mass Spectroscopy* (GC-MS). Minyak atsiri dianalisis menggunakan GCMS - QP2010S SHIMADZU dilengkapi dengan kolom Rtx-5MS (panjang 30 m, diameter dalam 0,25 mm) : 0,1 µl minyak diinjeksikan dalam kolom dengan kondisi suhu injektor: 290°C, suhu oven dari 70°C hingga 280°C (4°C/menit), gas pembawa He dengan kecepatan aliran 0,5 mL/menit pada 290°C, *split ratio* 193, dan tekanan 13.7 kPa.

Analisis aktivitas anti jamur

Penyiapan inokulum jamur dilakukan dengan menumbuhkan masing-masing *Aspergillus* pada media PDA miring kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Spora diambil dengan

menambahkan 3 ml 0,05% tween 80. Konsentrasi suspensi spora yang digunakan untuk pengujian adalah 10^7 spora/ml. Penghitungan konsentrasi spora dihitung menggunakan haemocitometer.

Pengujian aktivitas anti jamur dilakukan dengan *food poisoned technique* (Perucci *et al.*, 1994) menggunakan media Potato Dextrosa Agar (PDA). Minyak atsiri daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C.) ditambahkan ke dalam media PDA cair pada temperatur 50-55°C dan kemudian dituang pada cawan petri berdiameter 10 cm. Variasi konsentrasi minyak atsiri yang digunakan yaitu 0%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; dan 0,20%. Minyak atsiri dituangkan dalam media dengan penambahan 0,1 % Tween 80. Jamur kemudian diinokulasikan ketika medium sudah padat dengan cara satu *needle point* suspensi spora dalam media semisolid diinokulasikan ke dalam media uji sebanyak 3 titik per cawan petri. Pengujian dilakukan sebanyak 2 ulangan. Setelah itu diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Kontrol dilakukan dengan menumbuhkan jamur pada media dengan penambahan 0,1% Tween 80 namun tanpa penambahan minyak atsiri daun jeruk purut.

Pengamatan pertumbuhan jamur dilakukan setiap hari selama 7 hari dengan cara mengukur diameter koloni jamur. Prosentase penghambatan pertumbuhan koloni jamur dapat dihitung dengan persamaan berikut (de Billerbeck *et al.*, 2001):

$$\text{Persentase Penghambatan} = \frac{D_c - D_o}{D_c} \times 100\%$$

Keterangan :

Dc = Diameter rata-rata koloni kontrol

Do = Diameter rata-rata koloni perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat fisik dan kimia minyak atsiri dari daun jeruk purut disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Sifat Fisik dan Kimia Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut

Parameter	Nilai
Bobot jenis pada suhu 25°C	0,8601
Indeks refraksi pada suhu 20°C	1,4523
Angka asam	1,8 mg KOH/g minyak
Angka ester	91,3 mg KOH/g minyak
Kelarutan dalam alkohol	Larut dalam alkohol 90% 1:2 volume

Bobot jenis merupakan kriteria yang penting untuk menentukan mutu dan kemurnian minyak atsiri. Bobot jenis minyak atsiri dipengaruhi oleh berat molekul senyawa penyusun minyak atsiri dan tingkat kejenuhannya. Bobot jenis minyak atsiri akan naik dengan meningkatnya berat molekul senyawa penyusunnya dan banyaknya ikatan rangkap. Pengukuran indeks refraksi dimaksudkan untuk mengetahui tingkat kemurnian minyak atsiri karena masing-masing jenis minyak atsiri mempunyai indeks refraksi tertentu. Minyak yang mengalami penurunan mutu maka indeks refraksinya menjadi rendah (Rusli dan Hermani, 1988). Kelarutan minyak atsiri dapat berubah karena pengaruh umur simpan. Selama penyimpanan minyak atsiri makin sulit larut dalam alkohol. Perbedaan tingkat kelarutan ini sangat dipengaruhi oleh komponen kimia yang terkandung dalam minyak atsiri. Kelarutan dalam alkohol digunakan untuk mengetahui kerusakan akibat oksidasi dan polimerisasi.

Minyak atsiri daun jeruk purut memiliki kelarutan dalam alkohol 90 % dengan 1:2 volume. Semakin lama penyimpanan minyak atsiri maka akan menyebabkan kenaikan kelarutan minyak atsiri. Nilai kelarutan

minyak atsiri juga dipengaruhi jenis kesegaran bahan yang disuling. Pada minyak peppermint yang disuling dari herba basah akan lebih larut dalam alkohol 70% dibandingkan dengan herba kering, tetapi kelarutan dalam alkohol 70% tersebut juga akan berkurang setelah penyimpanan. Bilangan ester menunjukkan banyaknya miligram KOH yang dibutuhkan untuk menyabunkan ester yang terdapat di dalam satu gram minyak. Adanya ester yang terkandung di dalam minyak atsiri erat hubungannya dengan bau wangi yang muncul. Makin tinggi kandungan ester dalam minyak atsiri, maka bau wangi yang muncul akan makin kuat. Di Indonesia belum ada standar mutu untuk minyak atsiri daun jeruk purut, sehingga nilai-nilai seperti bobot jenis, indeks refraksi, angka asam, angka ester, dan kelarutan dalam alkohol dalam penelitian ini, dapat menjadi acuan bagi penelitian tentang minyak atsiri berikutnya.

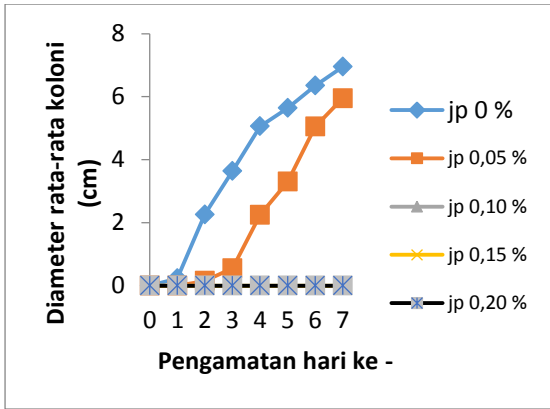
Hasil identifikasi komponen minyak atsiri pada daun jeruk purut menunjukkan bahwa minyak atsiri daun jeruk purut mengandung 22 komponen kimia. Komposisi minyak atsiri daun jeruk purut tersaji dalam Tabel 2.

Komponen utama penyusun minyak atsiri daun jeruk purut adalah citronella (87,91 %), linalool (3,96%), trans caryophylen (2,17%), citronellil asetat (1,79%), dan sabinen (1,78%). Komponen kimia paling dominan adalah citronella yang mencapai 87,91%. Augusta (2000) juga menyebutkan bahwa komponen dominan dalam minyak atsiri daun jeruk purut segar adalah citronela 81,41%. Selain itu, Anonim¹(2008) juga menyebutkan komponen penyusun paling dominan dalam minyak daun jeruk purut adalah citronella yang mencapai 81,49%.

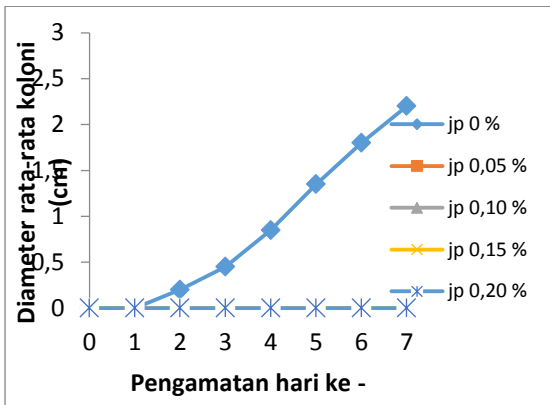
Tabel 2. Komponen Penyusun Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut

	Komponen kimia	Persentase (%)
1	α -pinene	0,05
2	Sabinene	1,78
3	2- β - pinene	0,12
4	β -myrcene	0,78
5	L-pelandrene	0,01
6	Delta 3 carene	0,05
7	α -terpinene	0,03
8	L-limonene	0,18
9	β -ocimene	0,35
10	5 heptenal 2,6 dimethyl	0,05
11	Gamma terpinene	0,08
12	Linalool oksida	0,03
13	Linalool oksida cis	0,15
14	L-linalool	3,86
15	E citral	0,01
16	Piridazine	0
17	Citronella	87,91
18	Cyclo octanol	0,03
19	3-cyclo hexene- 1-ol (4-terpineol)	0,01
20	Citronellil asetat	1,79
21	Trans caryophilene	2,17
22	Bycyclo germacrene	0,29

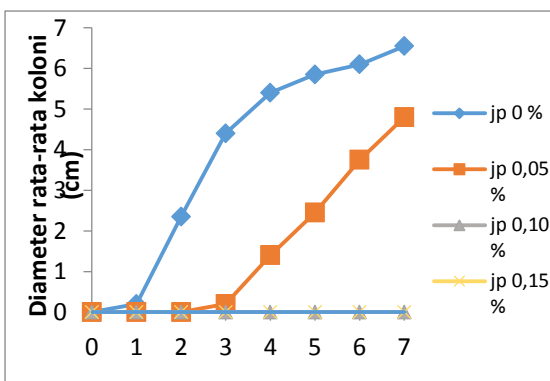
Minyak atsiri yang disuling dari bahan yang sama dapat memiliki komponen yang berbeda, tergantung pada jenis tanaman, iklim, tanah, umur panen, cara. Pola pertumbuhan jamur *Aspergillus* dengan penambahan minyak atsiri daun jeruk purut dapat dilihat pada Gambar 1-5.



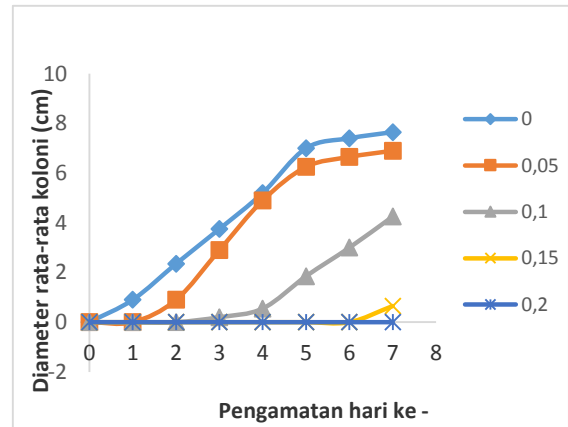
Gambar 1. Pola pertumbuhan diameter koloni jamur *Aspergillus niger* pada berbagai konsentrasi minyak atsiri daun jeruk purut



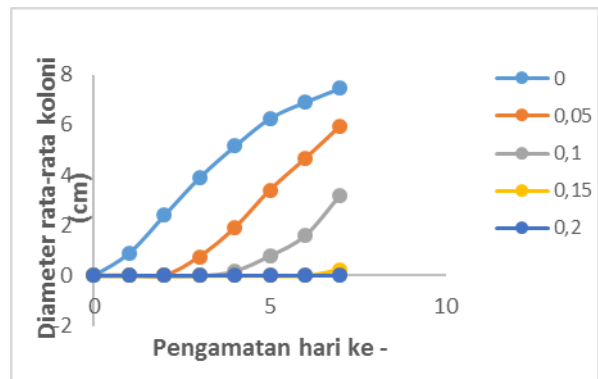
Gambar 2. Pola pertumbuhan diameter koloni jamur *Aspergillus tamari* pada berbagai konsentrasi minyak atsiri daun jeruk purut



Gambar 3. Pola pertumbuhan diameter koloni jamur *Aspergillus candidus* pada berbagai konsentrasi minyak atsiri daun jeruk purut



Gambar 4. Pola pertumbuhan diameter koloni jamur *Aspergillus flavus* pada berbagai konsentrasi minyak atsiri daun jeruk purut

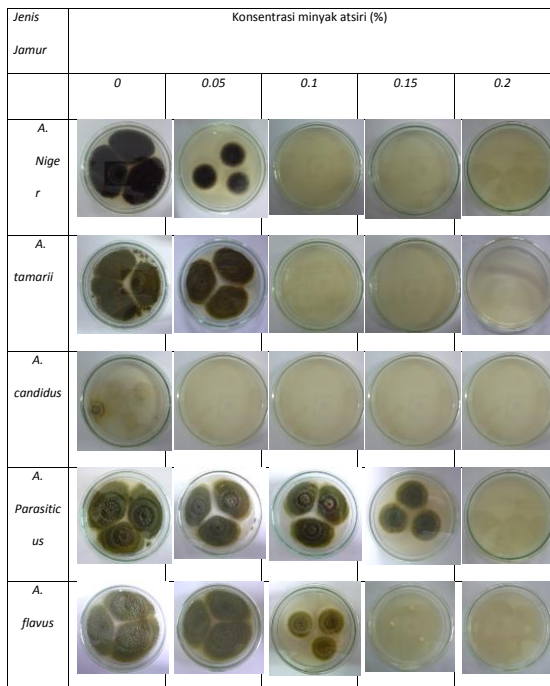


Gambar 5. Pola pertumbuhan diameter koloni jamur *Aspergillus parasiticus* pada berbagai konsentrasi minyak atsiri daun jeruk purut

Dari kelima jenis *Aspergillus* terlihat bahwa minyak atsiri jeruk purut mampu menghambat pertumbuhan jamur tersebut. *Aspergillus candidus* merupakan jenis yang paling mudah dihambat oleh minyak atsiri jeruk purut, diikuti oleh *A. tamari* dan *A. niger*. *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus* juga dihambat oleh minyak atsiri jeruk purut, namun dengan persentase penghambatan yang lebih kecil.

Penundaan germinasi spora pada *A. flavus* terjadi mulai konsentrasi minyak atsiri 0,05% (500 ppm). Pada konsentrasi 0,05% penundaan terjadi selama 1 hari, sedangkan pada konsentrasi 0,10% dan

0,15% penundaan terjadi selama 2 hari dan 6 hari. Pada konsentrasi 0,20% (2000 ppm) tidak terlihat adanya pembentukan miselia selama 7 hari pengamatan. Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri ditambahkan maka penundaan germinasi spora akan semakin lama. Sementara pada *A. Parasiticus*. Sementara itu pada *A. parasiticus*, penundaan pembentukan miselia terjadi mulai konsentrasi minyak atsiri 0,05% (500 ppm). Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri ditambahkan maka germinasi spora akan semakin terhambat. Pada konsentrasi 0,05% penundaan germinasi spora selama 2 hari. Sedangkan pada konsentrasi 0,10% dan 0,15% terjadi penundaan selama 3 hari dan 6 hari berturut-turut. Pada konsentrasi 0,20% (2000 ppm) tidak terlihat adanya pertumbuhan miselia selama 7 hari pengamatan. Pertumbuhan diameter koloni *Aspergillus parasiticus* dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pertumbuhan koloni *Aspergillus* pada beberapa konsentrasi minyak atsiri jeruk purut setelah hari ke 7

KESIMPULAN

Komponen utama penyusun minyak atsiri jeruk purut adalah citronella (87,91%). Minyak atsiri ini sangat efektif dalam menghambat jenis *Aspergillus*, terutama *A. candidus*, *tamarii* dan *niger*. Sementara itu *A. parasiticus* dan *A. flavus* yang merupakan dua jenis *Aspergillus* yang seringkali menimbulkan masalah munculnya aflatoksin pada bahan pangan, juga bisa dihambat, namun dengan kemampuan penghambatan yang lebih rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Angioni, A., Barra, A., Russo, M. T., Coroneo, V., Dess, S., and Cabras, P., 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3073-3078.
- Bousbia, N., M.A. Vian, M. A. Ferhat, E. Petitcolas, B. Y Meklati, F. Chemat. 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 114, 355-362
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Carson, C. F. and Riley, T. V. 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca acternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 264-269.
- Chang, H. T., Cheng, Y. H., Wu, C. L., Chang, S. T., Chang, T. T., and Su, Y. C. 2008. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var.

- formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technology*, 99, 6266–6270.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., and Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.
- Hutadilok-Towatana, N., Chaiyambutti, P., Panthong, K., Mahabusarakam, W., Rukachaisirikul, V., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some plants used in Thai folk medicine. *Pharm. Biol.* 44, 221-228.
- Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., Ohigashi, H., 1995. Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumorpromoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2779-2783.
- Murthy, P. S., Ramalaksmi, K., and Srinivas, P. 2009. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food chemistry*, 114, 1014-1018.
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam-Zollo, P.H., and Mathura, S.B. 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 329-334.
- Ong, C.Y., Ling, S.K., Ali, R.M., Chee, C.F., Samah, Z.A., Ho, A.S.H., Teo, S.H., Lee, H.B., 2009. Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* B 96, 216-222.
- Pitarokili, D., Couladis, M., Panayotarou, N. P., and Tzakou, O. 2002. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6688-6691.
- Perucci, S., Manciant, F., Ciont, P.L., Flamini, G., Morelli, I. and Macchioni, G. 1994. In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsporum canis* and *M. gypseum*. *Planta Medica*, 60, 184–187.
- Sanchez, E., Heredia, N., and Garcia S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extract of agave species. *International Journal of Food Microbiology*. 98, 271-279.
- Tiwawech, D., Hirose, M., Futakuchi, M., Lin, C., Thamavit, W., Ito, N., Shirai, T., 2000. Enhancing effects of Thai edible plants on 2-amino-3,8-dimethylimidazo(4,5-f)quinoxaline-hepatocarcinogenesis in a rat medium-term bioassay. *Cancer Lett.* 158, 195-201.
- Tripathi, R. D., Banerji, R., Sharma M. L., Balasurbrahmanyam V. R., and Nigam S. K. 1985. Essential oil from a new strain of *Ocimum gratissimum* (Clocimum) against betel vine pathogenic fungi. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 2262-2277.
- Violon, C. and Chaumont. J. P. 1994. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 128, 151-153.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwanichai, T., Thubthimthed, S., 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai

medicinal plants. *Fitoterapia* 76,
233-236.
Wong, S.P., Leong, L.P., Koh, J.H.W.,
2006. Antioxidant activities of
aqueous extracts of selected
plants. *Food Chem.* 99, 775-783.