



## IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF EKSTRAK DAUN CENGKEH (*Syzygium aromaticum*) SEBAGAI INHIBITOR *Streptococcus mutans*

### IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN CLOVE LEAVES (*Syzygium aromaticum*) EXTRACT AS INHIBITOR *Streptococcus mutans*

Usep Suhendar<sup>1</sup>, Sogandi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Universitas Pakuan, Jalan Pakuan Utara, Bogor Tengah, Bogor, Jawa Barat 16143

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jl Sunter Karya-Sunter, Jakarta Utara 14356

\*Corresponding author: [sogandi@uta45jakarta.ac.id](mailto:sogandi@uta45jakarta.ac.id)

Naskah Diterima: 20 Agustus 2019; Direvisi: 24 September 2019; Disetujui: 24 Oktober 2019

#### Abstrak

Karies gigi adalah penyakit yang umum dialami oleh masyarakat yang terjadi karena buruknya kebersihan mulut. Kebiasaan masyarakat yang kurang menjaga kebersihan mulut mengakibatkan terbentuknya plak. Plak pada gigi terbentuk karena aktivitas dari berbagai macam mikroorganisme di mulut. Mikroorganisme yang diketahui terlibat dalam pembentukan karies gigi adalah *Streptococcus mutans*. Salah satu bahan alternatif sebagai antibakteri adalah daun cengkeh. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif daun cengkeh dan mengetahui mekanisme aksinya dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang digunakan dalam penelitian ini dimaserasi menggunakan metanol 96%. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar, senyawa bioaktif diidentifikasi menggunakan *gas chromatography mass spectrometry* dan perubahan membran sel bakteri diamati dengan *scanning electron microscopy*. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak metanol daun cengkeh memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan zona hambat sebesar  $\pm 32$  mm serta nilai konsentrasi hambat minimum 20% ekstrak. Mekanisme aksi penghambatan ekstrak daun cengkeh terhadap pertumbuhan bakteri diduga dengan membuat lubang pada membran sel bakteri. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa daun cengkeh memiliki kandungan senyawa bioaktif *3-allyl-6-methoxyphenol-eugenol*, *caryophyllene*, *1,4,7-cycloundecatriene*, *1,5,9,9-tetramethyl phenol*, *2-methoxy-4-(2-propenyl)*, dan *eugenol acetate* yang dapat menjadi kandidat penghasil senyawa aktif untuk mengatasi karies gigi.

**Kata kunci:** Antibakteri; Bioaktif; Mekanisme aksi; *Streptococcus mutans*; *Syzygium aromaticum*

#### Abstract

Dental caries is a common disease experienced by people who do not maintain oral hygiene. Habits of not maintain oral hygiene result in the formation of plaque. The microorganism known to be involved in the formation of dental caries is *Streptococcus mutans*. Plants that have antibacterial properties, such as clove (*Syzygium aromaticum*) leaf, can be an alternative for carrying this problem. This study aims to identify the bioactive compounds of clove leaves and to determine the mechanism of its action in inhibiting the growth of *Streptococcus mutans*. Clove leaves were macerated using 96% methanol for the extraction. Antibacterial activity was examined by agar diffusion method, bioactive compounds were identified using *gas chromatography mass spectrometry*, and bacterial cell membrane changes were observed by an image captured using *scanning electron microscopy*. The results showed that the methanol extract of clove leaf had inhibitory activity on *Streptococcus mutans* growth, with inhibitory zones of  $\pm 32$  mm and the minimum inhibitory concentration of 20% extract. It was suspected that the mechanism of inhibitory action is by making pores in the bacterial cell membrane. The results also showed that the clove leaves contain bioactive compounds of *3-allyl-6-methoxyphenol-eugenol*, *caryophyllene*, *1,4,7-cycloundecatriene*, *1,5,9,9-tetramethyl phenol*, *2-methoxy-4-(2-propenyl)*, and *eugenol acetate* which can be candidates for producing active compounds to overcome dental caries.

**Keywords:** Antibacterial; Bioactive; Mechanism of action; *Streptococcus mutans*; *Syzygium aromaticum*

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v12i2.12251>

## PENDAHULUAN

Karies gigi merupakan gangguan kesehatan gigi yang paling umum dan tersebar luas di sebagian penduduk dunia. Tingkat keparahan dan prevalensi penyakit karies gigi di Indonesia terus meningkat. Penyakit gigi dan mulut merupakan penyakit masyarakat yang diderita oleh 90% penduduk Indonesia, dan bersifat progresif (Soni, Jain, & Kashaw, 2016).

Karies gigi merupakan penyakit yang disebabkan adanya penumpukan plak gigi yang banyak mengandung mikroba. Mikroorganisme terbanyak pada plak gigi yang bersifat asidogenik adalah *Streptococcus mutans*. Bakteri ini merupakan flora normal rongga mulut, tetapi apabila populasinya meningkat dapat berubah menjadi patogen (Dewi, Nur, & Hertriani, 2015). Kolonisasi bakteri *Streptococcus mutans* terjadi setelah gigi berlubang dan jika dibiarkan akan terus membentuk koloni pada bagian dalam gigi, sehingga kerusakan gigi tidak dapat terhindarkan. Apabila pembentukan koloni bakteri ini dapat dicegah, kemungkinan kerusakan gigi tidak terjadi atau berkurang (Asymal, Astuti, & Devijanti, 2018).

Permasalahan penyakit karies gigi yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus mutans* ini dapat ditangani dengan mencari alternatif bahan alam yang memiliki sifat antibakteri. Pentingnya untuk mencari sumber antibiotik baru untuk mengatasi masalah karies gigi adalah karena dewasa ini banyak ditemukan bakteri yang sudah resisten terhadap antibiotik konvensional, sehingga menjadi masalah yang serius. Masalah resistensi bakteri ini dapat ditanggulangi dengan melakukan penelitian untuk mencari sumber-sumber antibakteri yang berasal dari kekayaan alam Indonesia. Salah satu bahan alam yang sudah dikenal sebagai tanaman obat tradisional dan penyedap masakan adalah cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang banyak terdapat di daerah Maluku. Tanaman tersebut tergolong ke dalam kelompok *Myrtaceae* dengan ordo *Myrtales*. Cengkeh memiliki aroma sangat khas, yang dihasilkan oleh senyawa eugenol, yaitu senyawa utama tanaman ini dengan kandungan berkisar 72–90% (Risitiansyah, Yenita, Melviana, & Annisa, 2018).

Daun cengkeh merupakan bagian dari pohon cengkeh yang selama ini masih kurang dimanfaatkan dibandingkan dengan bagian lainnya, seperti bunga ataupun tangkai cengkeh yang banyak digunakan sebagai bahan baku industri rokok dan bumbu masakan. Penelitian sebelumnya telah mengungkapkan bahwa pada daun cengkeh mengandung senyawa kimia berupa flavonoid, triterpenoid, fenolat, dan tanin yang merupakan senyawa bersifat antibakteri (Huda, Rodhiansyah, & Ningsih, 2018). Daun cengkeh juga diketahui mengandung senyawa *eucalyptol*, kariofilen,  *$\alpha$ -cardinol*, dan *limonene* (Mohammed, Ahmed, & Hussien, 2015).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak metanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, mengetahui nilai kadar hambat minimum (KHM) ekstrak daun cengkeh, mengetahui senyawa yang paling banyak terkandung dalam ekstrak metanol daun cengkeh, dan mengetahui mekanisme aksi penghambatan dengan melihat perubahan permukaan sel bakteri *Streptococcus mutans* setelah dipaparkan dengan ekstrak daun cengkeh.

## MATERIAL DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol 96%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (asam sulfat), NH<sub>4</sub>OH (ammonium hidroksida), HCl (asam klorida), FeCl<sub>3</sub> (besi klorida), logam Mg (magnesium), pelarut amil alkohol, akuades, NaOH (natrium hidroksida), ampicilin, NaCl (natrium klorida), pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Liebermann-Burchard, BaCl<sub>2</sub> 1% (barium klorida), Serbuk Zn (seng), media agar darah, *nutrient broth* (NB), dan bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 31987. Daun cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Ballitro) Bogor. Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik (Mettler Toledo®), aluminium foil, gelas ukur (Iwaki pyrex), gelas piala, waterbath (Memmert®), cawan petri (Iwaki pyrex®), pipet tetes, oven, laminar air flow (LAF), GCMS QP2010S SHIMADZU dengan kolom Rastek RXi-5MS dan autoklaf (Hirayama).

### Pembuatan Serbuk Simplisia

Simplisia diperoleh dari daun cengkeh yang telah berumur tiga sampai empat bulan, ditandai dengan warna daun yang berwarna hijau terang, karena pada umur tersebut kandungan metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya sudah mencukupi. Daun cengkeh dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada bahan simplisia. Setelah itu dilakukan perajangan untuk mempermudah pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah proses pengeringan selesai, bahan simplisia kering dihaluskan, kemudian disaring dan diayak. Tujuan dari pengayakan ini adalah untuk memperluas permukaan kontak partikel dengan pelarut, sehingga hasil ekstraksi lebih maksimal (Wael, Mahulette, Watuguly, & Wahyudi, 2018).

### Pembuatan Ekstrak Metanol

Serbuk simplisia seberat 1 kg diekstraksi menggunakan metode maserasi melalui proses perendaman dengan pelarut metanol 70% sebanyak 5 L selama 3 x 24 jam, dan dilakukan pengadukan. Rendemen yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring. Kemudian ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C sampai diperoleh ekstrak kental daun cengkeh, dan dihitung persentase rendemen ekstraknya.

### Skrining Fitokimia (Banu & Cathrine, 2015)

Uji Alkaloid dilakukan dengan menimbang ekstrak 0,5 gram dan ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL akuades, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk pengujian pada pereaksi Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff. Pada pereaksi Mayer, tiga tetes ekstrak daun cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer. Bila terbentuk endapan putih atau kuning, hal tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Pada pereaksi Bouchardat, tiga tetes ekstrak daun cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat. Bila terbentuk endapan cokelat sampai hitam, hal tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Sedangkan pereaksi Dragendorff

dilakukan dengan mengambil tiga tetes ekstrak daun cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, bila terbentuk endapan jingga sampai merah cokelat atau merah bata, hal tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi di atas positif maka sampel mengandung alkaloid.

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan mengambil ekstrak kental daun cengkeh kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 10 mL air panas. Larutan tersebut dididihkan dan disaring dalam keadaan panas. Sebanyak 5 mL filtrat diambil dan ditambah dengan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl, dan 2 mL amil alkohol. Campuran dikocok dan biarkan memisah. Bila terbentuk warna kuning, jingga atau merah pada lapisan amil alkohol memberikan indikasi adanya flavonoid.

Pemeriksaan saponin pada sampel dilakukan dengan mengambil ekstrak kental daun cengkeh dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas secukupnya, dikocok selama 15 menit. Bila setelah ditetesi asam klorida 2 N terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit, maka hal tersebut memberikan indikasi adanya saponin.

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan mengambil ekstrak kental daun cengkeh ditambahkan dengan 10 mL akuades dan disaring. Filtrat kemudian diencerkan dengan akuades sampai tidak berwarna. Sebanyak 2 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman, hal tersebut memberikan indikasi adanya tanin.

Steroid dan triterpenoid ditentukan dengan meletakkan sebanyak 30 mg ekstrak pada pelat tetes ditambahkan dengan asam asetat glasial sebanyak 5 tetes dan asam sulfat pekat sebanyak 2 tetes. Ekstrak dikatakan mengandung steroid jika terbentuk warna biru atau hijau, sedangkan ekstrak dikatakan mengandung triterpenoid jika memberikan warna merah atau ungu.

Kandungan senyawa fenol ditentukan dengan melarutkan 3 mL larutan ekstrak uji, kemudian dibagi dalam 2 bagian larutan, yaitu larutan A dan larutan B. Larutan A sebagai blanko sedangkan larutan B direaksikan

dengan larutan besi (III) klorida 10%, warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya fenol.

### Penyiapan Kultur Bakteri Uji

Bakteri uji *Streptococcus mutans* ditumbuhkan pada media selektif, yaitu media *blood agar plate* yang mengandung *trypton* 27%, *soy peptone* 9,3%, *sodium chloride* 9,3%, *lithium chloride* 18,6%, *magnesium sulphate* 7% dan agar 13%. Media dibuat dengan menimbang bubuk *blood agar base* dalam 1 L akuades, kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Botol kaca yang sudah berisi media ditutup dengan tutup botol yang dilapisi dengan aluminium *foil* dan diikat dengan benang. Media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang telah steril didinginkan hingga mencapai suhu 45–50 °C dan ditambahkan 5% darah kambing. Media dituang ke dalam *plate* dan ditunggu hingga memadat.

### Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri uji *Streptococcus mutans* diinokulasikan di cawan petri berisi media *Blood Agar* yang sudah disiapkan terlebih dahulu. Inokulasi bakteri *Streptococcus mutans* pada media *Blood Agar* dilakukan dengan mencelupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi bakteri *Streptococcus mutans*, kemudian dioleskan di atas permukaan media. Kertas cakram kosong direndamkan masing-masing ke dalam larutan ekstrak daun cengkeh, kontrol positif ampisilin (10 mg/mL), dan kontrol negatif akuades. Kertas cakram ditempelkan pada permukaan media dan didiamkan selama 30 menit dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (*triplo*). Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

### Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Uji KHM dilakukan dengan metode difusi agar media. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam pengujian ini adalah 10, 15, 20, 25, dan 30%. Pengukuran zona bening dilakukan setelah bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Konsentrasi terendah sampel yang masih memberikan zona hambat

pada media agar ditetapkan sebagai nilai KHM.

### Identifikasi Senyawa Aktif

Senyawa bioaktif dari ekstrak metanol daun cengkeh dianalisis menggunakan *instrument GCMS* (Shimadzu GCMS-QP 2010 Ultra). Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rxi-1MS (100% *dimethyl polysiloxane*) yang memiliki panjang kolom 30 m dan berdiameter 0,25 mm. Gas pembawa helium dikondisikan pada tekanan 37,1 kPa, dengan volume injeksi sebanyak 5 µL, suhu *injector* 250 °C, suhu *ion source* 230 °C, suhu permukaan 230 °C, dan dengan *mode split* 10. Kolom diprogram dari 70 °C, dan dinaikkan sampai 230 °C dengan laju kenaikan adalah 10 °C/menit, kemudian ditahan selama 3 menit dengan suhu akhir 270 °C.

### Analisis Perubahan Morfologi Sel

Analisis perubahan morfologi sel dilakukan untuk mengetahui perubahan struktur sel bakteri setelah diberikan perlakuan pemberian ekstrak daun cengkeh. Kultur cair bakteri *Streptococcus mutans* berumur semalam diinokulasi sebanyak 250 µL ke dalam media cair dan ditumbuhkan pada 37 °C selama 5 jam. Kultur kemudian disentrifugasi (6.000 xg, 4 °C selama 3 menit). Endapan sel hasil sentrifugasi disuspensikan kembali dengan menambahkan 1.000 µL *buffer* fosfat yang mengandung ekstrak metanol daun cengkeh. *Buffer* fosfat tanpa penambahan ekstrak dijadikan sebagai kontrol negatif. Suspensi sel kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit dengan digoyang dalam inkubator, kemudian disentrifugasi kembali (6.000 xg, 4 °C selama 3 menit). Sel difiksasi dan diamati menggunakan *Scanning Electro Microscope* (SEM) seri JCM.

### HASIL

Penelitian ini diawali dengan determinasi tanaman yang digunakan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar spesies tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah benar dari tanaman *Syzygium aromaticum*.

## Ekstraksi

Daun cengkeh diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 70%. Metode maserasi merupakan metode ekstraksi dengan cara dingin yang paling mudah untuk dilakukan. Tujuan dari metode tersebut agar tidak ada zat aktif yang rusak oleh pemanasan. Dari hasil maserasi 1 kg serbuk kering daun cengkeh didapatkan ekstrak kental sebanyak 100,08 g dengan persen rendemen 10 %.

Hasil organoleptik menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh memiliki bentuk kental, warna cokelat kemerahan, rasanya pahit, dan berbau khas cengkeh. Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak metanol daun cengkeh berdasarkan hasil skrining secara kualitatif adalah senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, triterpenoid, dan fenolik (Tabel 1).

**Tabel 1.** Senyawa kimia ekstrak metanol daun cengkeh

Senyawa kimia	Identifikasi
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Tannin	+
Steroid	+
Triterpenoid	+
Fenolik	+

## Aktivitas Antibakteri

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol menunjukkan bahwa ekstrak dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening berdiameter  $\pm 32$  mm (diameter kertas cakram 6 mm) (Tabel 2). Berdasarkan hasil uji

aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun cengkeh, kontrol positif yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*, sedangkan pada kontrol negatif dapat dilihat bahwa tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Selanjutnya dilakukan pengujian kadar hambat minimum.

**Tabel 1.** Aktivitas antibakteri ekstrak daun cengkeh

Sampel	Diameter zona hambat (mm)
Kontrol negatif (akuades)	6,00 $\pm$ 0,00
Kontrol positif (ampisilin)	37,07 $\pm$ 0,32
Ekstrak metanol	32,41 $\pm$ 0,18

## Uji Kadar Hambat Minimum (KHM)

Berdasarkan pengujian nilai KHM yang dilakukan pada konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30% diketahui pada konsentrasi 20% masih terdapat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak terlihatnya zona bening di sekitar kertas cakram. Sementara itu, pada konsentrasi 25 dan 30% sudah memperlihatkan adanya zona bening. Hal ini menandakan sudah tidak adanya pertumbuhan bakteri *S. mutans* pada konsentrasi 25%.

menggunakan instrumen GCMS. Hasil identifikasi menunjukkan terdapat 4 senyawa dengan urutan senyawa dari yang kelimpahannya terbanyak adalah *3-allyl-6-methoxyphenol eugenol* (57,04%), *phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl) eugenol acetate* (26,18%), *caryophyllene* (14,61%), dan *1,4,7-cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl* (2,17%).

## Identifikasi Senyawa Bioktif

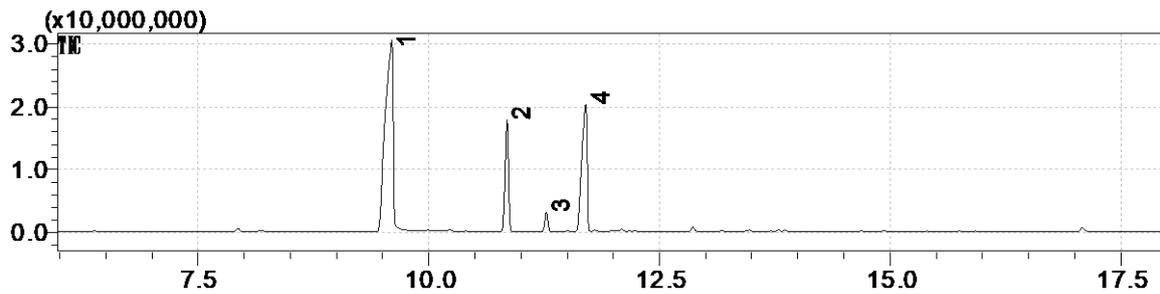
Identifikasi jenis senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol daun cengkeh diidentifikasi

## Mekanisme Aksi

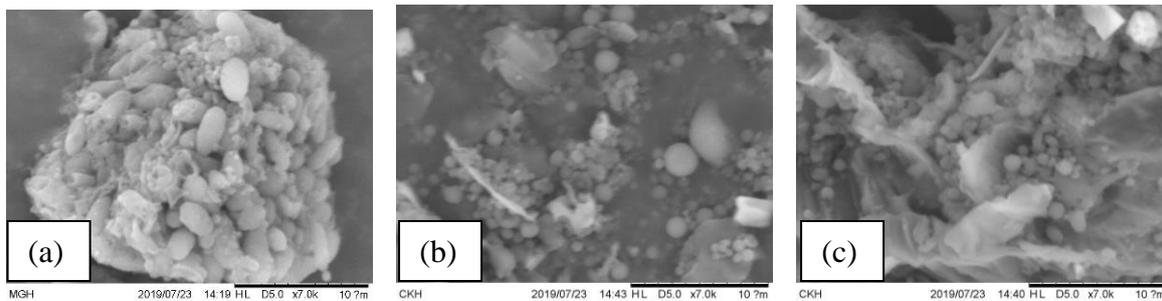
Hasil pengamatan sel *S. mutans* yang telah diberi perlakuan memperlihatkan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh memiliki kemampuan untuk mengganggu integritas membran bakteri *S. mutans*. Hal ini dilihat dari

lisisnya sel bakteri (Gambar 2). Kerusakan pada membran sel membuat komponen intraselular asam amino, asam nukleat dan

protein akan keluar dari sel dan mengakibatkan kematian pada sel bakteri.



**Gambar 1.** Spektrogram hasil GCMS ekstrak metanol daun cengkeh



**Gambar 2.** Perubahan morfologi sel yang disebabkan oleh ekstrak metanol daun cengkeh dengan SEM. (a) tanpa perlakuan, bentuk sel bulat utuh, (b) dengan perlakuan 1 KHM, sebagian sel tampak menyusut, (c) dengan perlakuan 2 KHM, sel terlihat semakin mengecil dan menyusut

## PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Simplisia daun cengkeh diekstraksi dengan metode maserasi. Keuntungan proses maserasi adalah murah, mudah dilakukan dengan alat-alat sederhana, dan cara penarikan zat aktif tidak menggunakan pemanasan. Serbuk simplisia dimaserasi menggunakan pelarut metanol 70%. Penggunaan cairan pengeksrak ini didasari bahwa metanol lebih selektif, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih rendah, kapang dan kuman lebih sulit tumbuh dalam konsentrasi lebih dari 20% sehingga dapat mencegah tumbuhnya jamur pada ekstrak (Sogandi, Mustopa, Artika, & Budiarto, 2015).

Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Endapan tersebut diperkirakan adalah kompleks kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Mayer, larutan merkuriem (II) klorida ditambah kalium iodida akan bereaksi membentuk endapan merah merkuriem (II) iodida. Jika kalium iodida yang ditambahkan

berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat (II). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Setyowati, Ariani, Ashadi, & Rahmawati, 2014)

Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan reaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismutil ( $BiO^+$ ). Agar  $Bi^{3+}$  tetap berada dalam larutan, larutan itu ditambah asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri. Selanjutnya ion  $Bi^{3+}$  dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk bismut (III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida

berlebih. Pengujian senyawa alkaloid dengan pereaksi Dragendorff menggunakan atom nitrogen untuk membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion  $K^+$  yang merupakan ion logam (Setyowati *et al.*, 2014).

Identifikasi flavonoid menggunakan uji Wilstater menunjukkan warna jingga yang berarti positif adanya flavonoid. Magnesium dan asam klorida pada uji Wilstater bereaksi membentuk gelembung-gelembung yang merupakan gas  $H_2$ , sedangkan logam Mg dan HCl pekat pada uji tersebut berfungsi untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid, sehingga terbentuk perubahan warna menjadi merah atau jingga. Jika dalam suatu ekstrak tumbuhan terdapat senyawa flavonoid akan terbentuk garam flavilium saat penambahan Mg dan HCl yang berwarna merah atau jingga (Setyowati *et al.*, 2014).

Saponin bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut seperti air dan saponin juga bersifat nonpolar karena memiliki gugus hidrofob, yaitu aglikon (sapogenin). Busa yang dihasilkan pada uji saponin disebabkan karena adanya glikosida yang dapat membentuk busa dalam air dan terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya.

Pengujian tanin dilakukan dengan penambahan  $FeCl_3$  yang bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada tanin. Fungsi  $FeCl_3$  adalah menghidrolisis golongan tanin sehingga akan menghasilkan perubahan warna biru kehitaman dan tanin terkondensasi yang menghasilkan warna hijau kehitaman (Pardede, Manjang, & Efdi, 2013).

Identifikasi terpenoid dan steroid pada ekstrak etanol daun cengkeh memberikan hasil positif dengan terbentuknya cincin cokelat pada batas antara kloroform dan  $H_2SO_4$ . Selain itu, ketika ditambahkan 2 mL asam sulfat terlihat warna hijau menjadi warna hijau pekat. Perubahan warna ini disebabkan adanya oksidasi pada golongan senyawa terpenoid atau steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Prinsip reaksi dalam uji terpenoid adalah kondensasi atau pelepasan  $H_2O$  dan penggabungan karbokation dan menyebabkan adisi elektrofilik diikuti dengan pelepasan hydrogen. Gugus hydrogen beserta elektronnya dilepas sehingga mengalami

perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan adanya cincin cokelat (Pardede *et al.*, 2013).

### Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi kertas cakram. Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. mutans*. Bakteri tersebut merupakan golongan bakteri Gram positif yang berbentuk kokus (berbentuk bulat). Sampel dikatakan mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri apabila terdapat daerah bening di sekitar kertas cakram akibat pengaruh ekstrak metanol daun cengkeh (1 g/mL). Kontrol positif yang digunakan adalah ampisilin, yang merupakan antibiotik golongan penisilin I yang digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri Gram positif dan Gram negatif. Hasil penelitian terdahulu menyebutkan bahwa ampisilin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan diameter zona bening sebesar 14 mm (Surwade *et al.*, 2018). Menurut Nworu dan Esimone (2006), mekanisme kerja ampisilin adalah menghambat sintesis dinding sel bakteri dan enzim transpeptidase, sehingga tidak terjadi biosintesis sel. Kontrol positif berfungsi sebagai kontrol dari sampel ekstrak metanol dengan membandingkan diameter zona hambat yang terbentuk. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades steril yang berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri uji.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan dari uji aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* adalah  $\pm 32$  mm. Aktivitas ini lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari buah mengkudu yang hanya memiliki zona hambat sebesar  $\pm 17$  mm (Sogandi & Nilasari, 2019). Hal tersebut mengindikasikan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun cengkeh terhadap bakteri Gram positif *S. mutans* tergolong dalam kategori kuat, karena diameter zona hambat  $> 21$  mm. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur yang tebal dan kaku serta mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat, sedangkan dinding sel

bakteri Gram negatif terdiri atas satu atau lebih 20 lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan (Nwokocha *et al.*, 2012).

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak metanol menunjukkan adanya senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid, terpenoid, saponin, tanin, dan fenolik. Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang mempunyai kecenderungan untuk mengikat protein, sehingga mengganggu proses metabolisme bakteri. Selain itu, flavonoid juga berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Flavonoid memiliki struktur kimia berupa cincin beta dan gugus -OH yang diduga bertanggungjawab sebagai aktivitas antibakteri (Nugraha, Prasetya, & Mursiti, 2017).

Saponin memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan mekanisme kerja, yaitu menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Hal ini dapat terjadi karena zat aktif yang terdapat pada permukaan saponin mirip dengan deterjen, akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Kemudian saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan kebocoran dan sitoplasma keluar dari sel yang mengakibatkan kematian di sel bakteri Gram negatif dan positif (Suresh, Babu, & Sitram, 2013).

Tanin memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan mekanisme kerja, yaitu mengganggu permeabilitas sel. Hal ini mengakibatkan sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat dan mengalami kematian. Senyawa tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin (Arlofa, 2015). Sementara itu, alkaloid memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan mekanisme kerja mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri. Pada senyawa alkaloid juga terdapat gugus basa mengandung nitrogen yang akan bereaksi dengan senyawa asam amino

penyusun dinding sel bakteri. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino yang akan menimbulkan ketidakseimbangan genetik pada rantai DNA sehingga akan mengalami kerusakan dan mendorong terjadinya lisis bakteri yang akan menyebabkan kematian sel pada bakteri (Arlofa, 2015).

Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom (Gad, El-Baky, Ahmed, & Gad, 2016). Triterpenoid memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme berupa reaksi dengan purin pada membran luar sel bakteri, yang membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya purin. Rusaknya purin mengurangi permeabilitas membran sel bakteri yang akan mengakibatkan sel kekurangan nutrisi dan akan menghambat pertumbuhan atau mengalami kematian.

Mekanisme kerja senyawa fenol sebagai antibakteri adalah melisis sel dan menyebabkan denaturasi protein, menghambat pembentukan protein sitoplasma dan asam nukleat serta menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel (Sasaki *et al.*, 2003).

### Hasil Uji Kadar Hambat Minimum (KHM)

Berdasarkan pengujian nilai KHM yang dilakukan pada konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30% terlihat bahwa pada konsentrasi 20% masih terdapat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak terlihatnya zona bening di sekitar kertas cakram. Sementara itu, pada konsentrasi 25 dan 30% sudah memperlihatkan adanya zona bening. Hal ini menandakan sudah tidak adanya pertumbuhan bakteri *S. mutans* pada konsentrasi 25%. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh memiliki aktivitas yang baik untuk bakteri Gram positif *S. mutans*. Nilai KHM ini sama besar dengan nilai KHM dari ekstrak etanol daun cengkeh terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang juga memiliki nilai KHM 20% (Risitiansyah *et al.*, 2018).

### Identifikasi Senyawa Bioktif

Senyawa *3-Allyl-6-methoxyphenol-eugenol* adalah senyawa organik dengan kandungan terbesar (57,04%) pada ekstrak

metanol daun cengkeh, dengan rumus molekul  $C_{10}H_{12}O_2$ . Senyawa ini juga terdapat pada pucuk cengkeh, seperti hasil penelitian yang dilakukan oleh Uddin, Shahinuzzaman, Rana, & Yaakob (2017). Selain mengandung senyawa 3-Allyl-6-methoxyphenol-Eugenol, pucuk cengkeh mengandung senyawa lain, di antaranya *caryophyllene*; *1,4,7-cycloundecatriene*; *1,5,9,9-tetramethyl*; dan *eugenol acetate* yang juga ditemukan dalam penelitian ini. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki manfaat dalam bidang pengobatan, di antaranya sebagai antiseptik, anestetik, analgesik, antioksidan, antiinflamasi, dan antimikroba.

Senyawa dengan kandungan terbesar kedua dalam ekstrak metanol daun cengkeh adalah *phenol*, *2-methoxy-4-(2-propenyl)*, *acetate* yang memiliki rumus molekul  $C_{12}H_{14}O_3$ . Senyawa terbanyak ketiga adalah *caryophyllene* dengan rumus molekul  $C_{15}H_{24}$  dan senyawa terbanyak keempat adalah *1,4,7-cycloundecatriene*, *1,5,9,9-tetramethyl* yang memiliki rumus molekul  $C_{15}H_{24}$ . Ketiga senyawa ini juga terkandung dalam ekstrak metanol bunga cengkeh yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Vibrio cholera* dan juga memiliki aktivitas antioksidan (Hemalatha, Nivetha, Mohanapriya, Sharmila, & Muthukumar, 2016).

### Mekanisme Aksi

Penggunaan SEM ditujukan untuk karakterisasi permukaan struktur biomaterial, pengukuran perlekatan sel, dan perubahan pada morfologi bakteri. Hasil SEM menunjukkan ekstrak metanol daun cengkeh diduga dapat merusak bagian membran sel bakteri *S. mutans*. Pengamatan permukaan sel bakteri *S. mutans* yang diberikan ekstrak metanol daun cengkeh dengan konsentrasi 1 KHM dan 2 KHM menunjukkan ukuran selnya mengecil atau mengerut jika dibandingkan ukuran sel pada kelompok kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak yang diberikan dapat menimbulkan susasana yang hipertonik terhadap sel bakteri. Saat sel berada pada medium hipertonik, cairan intrasel mengalir keluar yang mengakibatkan sel mengerut atau mengecil. Pada konsentrasi 1

KHM sel sudah mengalami perubahan bentuk, yaitu mengecil, dan pada konsentrasi 2 KHM sel menunjukkan perubahan bentuk yang semakin kecil. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin tinggi pula aktivitas yang terdapat di dalamnya, sehingga menyebabkan kerusakan sel bakteri *S. mutans* semakin parah.

### SIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini telah membuktikan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi sumber senyawa antibakteri penyebab karies gigi yang perlu dimurnikan dan diujikan dalam skala besar untuk mendapatkan senyawa tunggal sebagai pencegah karies gigi. Hasil analisis GCMS menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh memiliki kandungan senyawa *3-allyl-6-methoxyphenol-eugenol*; *phenol*, *2-methoxy-4-(2-propenyl)-eugenol acetate*, *caryophyllene*, dan *cycloundecatriene*, *1,5,9,9-tetramethyl*. Analisis permukaan sel bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan telah terjadi perubahan ukuran sel setelah diberikan ekstrak dan dapat melisis sel bakteri. Hasil ini memberikan informasi awal untuk aplikasi antibakteri alami. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi dan memurnikan senyawa aktif dari daun cengkeh yang bersifat antibakteri ini.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Ilmu Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan LPPM Universitas Pakuan Bogor yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Internal untuk pendanaan tahun 2019.

### REFERENSI

- Arlofa, N. (2015). Uji Kandungan senyawa fitokimia kulit durian sebagai bahan aktif pembuatan sabun. *International Journal of ChemTech Research*, 1(1), 18-22.
- Asymal, A., Astuti, E. R., Devijanti, R. (2018). Changes in the number of macrophage and lymphocyte cell in chronic periodontitis due to dental X-ray exposure. *Dental Journal*, 51(2), 99-103.

- Banu, K. S., & Cathrine, L. (2015). General techniques involved in phytochemical analysis. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 2(4), 25-32.
- Dewi, Z. Y., Nur, A., & Hertriani, T. (2015). Efek antibakteri dan penghambatan biofilm ekstrak sereh (*Cymbopogon nardus* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 1(2), 136-141.
- Gad, S. A., El-Baky, R. M. A., Ahmed, A. B., & Gad, G. F. M. (2016). In vitro evaluation of probiotic potential of five lactic acid bacteria and their antimicrobial activity against some enteric and food-borne pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 10(12), 400-409.
- Hemalatha, R., Nivetha, P., Mohanapriya, C., Sharmila, G., & Muthukumar, C. (2016). Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1189-1198. doi: 10.1007/s13197-015-2108-5
- Huda, M., Rodhiansyah., & Ningsih, D. S. (2018). Efektivitas ekstrak bunga cengkeh (*Eugenia aromatica*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Analisis Kesehatan*, 7(1), 710-716. doi: 10.26630/jak.v7i1.934
- Mohammed, N. H., Ahmed, M. H., & Hussien, M. O. (2015). Qualitative analysis of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) (clove) using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 5(2), 350-354.
- Nugraha, A. C., Prasetya, A. T., & Mursiti, S. (2017). Isolasi, identifikasi, uji aktivitas senyawa flavonoid sebagai antibakteri dari daun mangga. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2), 91-96.
- Nwokocha, C. R., Owu, D. U., McLaren, M., Murray, J., Delgoda, R., Thaxter, K., Young, L. (2012). Possible mechanisms of action of the aqueous extract of *Artocarpus altilis* (breadfruit) leaves in producing hypotension in normotensive sprague-dawley rats. *Pharmaceutical Biology*, 50(9), 1096-1102. doi: 10.3109/13880209.2012.658113
- Nworu, C., & Esimone, C. (2006). Comparative evaluation of three in vitro techniques in the interaction of ampicillin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(12), 605-611. doi: 10.4314/tjpr.v5i2.14638
- Pardede, A., Manjang, Y., & Efdi, M. (2013). Skrining fitokimia ekstrak metanol dari kulit batang manggis (*Garcinia cymosa*). *Media Sains*, 6(2), 60-66.
- Risitiansyah, D. U., Yenita., Melviana., & Annisa. (2018). Uji efektivitas antibiotik ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* secara in vitro. *Ibnu Sina Biomedika*, 2(1), 41-47. doi: 10.30596/isb.v2i1.1901
- Sasaki, H., Matsumoto, M., Tanaka, T., Maeda, M., Nakai, M., Hamada, S., & Ooshima, T. (2003). Antibacterial activity of polyphenol components in oolong tea extract against *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 38(1), 2-8. doi: 10.1159/000073913
- Setyowati, W. A. E., Ariani, S. R. D., Ashadi, M. B., & Rahmawati, C. P. (2014, June 21). *Skrining fitokimia dan identifikasi komponen utama ekstrak metanol kulit durian (Durio zibethinus Murr.) varietas petruk*. Paper presented at Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI, Surakarta, Indonesia. Retrieved from <https://www.scribd.com/document/339591365/SKRINING-FITOKIMIA-DAN-IDENTIFIKASI-KOMPONEN-UTAMA-EKSTRAK-METANOL-KULIT-DURIAN-Durio-zibethinus-Murr-VARIETAS-PETRUK-pdf>
- Sogandi., Mustopa, A. Z., Artika, I. M., & Budiarto, B. R. (2015). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* U10 isolated from tempoyak (fermented durian) made in Indonesia against *Salmonella typhi*.

- Microbiology Indonesia*, 9(2), 73-81. doi: 10.5454/mi.9.2.5
- Sogandi., & Nilasari, P. (2019). Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) and their antibacterial activity. *IOP Conference Series.: Earth Environmental Science*, 299(012020), 1-11. doi: 10.1088/1755-1315/299/1/012020
- Soni, A., Jain, R., & Kashaw, V. (2016). Antibacterial activity of *Morinda citrifolia* Linn fruits for acne inducing pathogens. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*, 8(1), 208-214
- Suresh, M., Babu, K., & Sitram, B. (2013). In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5(4), 679-684.
- Surwade, P., Ghildyal, C., Weikel, C., Luxton, T., Peloquin, D., Fan, X., & Shah, V. (2018). Augmented antibacterial Activity of ampicillin with silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *The Journal of Antibiotics*, 72(1), 50-53. doi: 10.1038/s41429-018-0111-6
- Uddin, A., Shahinuzzaman., Rana, S., & Yaakob, Z. (2017). Study of chemical composition and medical properties of volatile oil from clove buds (*Eugenia caryophyllus*). *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 8(2), 895-899. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(2).895-99
- Wael, S., Mahulette, F., Watuguly, T. W., & Wahyudi, D. (2018). Pengaruh ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap limfosit dan makrofag mencit balb/c. *Traditional Medicine*, 23(2), 79-83. doi: 10.22146/mot.38474