

Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi

Effect of cengkeh leaves and kayu manis cortex essential oils blend as anti dental plaque

Marisya Ardani, Sylvia Utami Tunjung Pratiwi, Triana Hertiani*)

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta

Abstrak

Plak gigi termasuk masalah kesehatan mulut dan gigi, yang disebabkan terbentuknya biofilm oleh mikroba mulut. Bakteri yang berperan dominan dalam pembentukan plak yaitu *Streptococcus mutans*. Penambahan kombinasi minyak atsiri dalam *mouthwash* diketahui dapat meningkatkan aktivitas penghambatan plak-biofilm. Minyak atsiri daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) dan kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.) dilaporkan efektif sebagai antibakteri dan antibiofilm terhadap *S. mutans*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi minyak cengkeh dan kayu manis terhadap kemampuan penghambatan pertumbuhan planktonik (antibakteri) dan biofilm *S. mutans* secara *in vitro* dan mengetahui komposisi optimum campuran tersebut. Pengujian antibakteri dilakukan pada media *Nutrient Broth*, menggunakan *microplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Pengujian penghambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm dilakukan pada media *BHI + 2% sukrosa*, menggunakan *microplate flexible U-bottom PVC 96 wells*. *Crystal violet 1%* digunakan untuk pewarnaan biofilm, sedangkan *Optical density (OD)* sampel dibaca pada λ 595 nm. Data berupa persen penghambatan dianalisis dengan persamaan *Simplex Lattice Design* untuk memperoleh komposisi optimum campuran. KLT-bioautografi dan KG-SM dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa maupun kemungkinan senyawa aktif antibakteri. Kesimpulan dari penelitian ini adalah campuran minyak atsiri cengkeh dan kayu manis terbukti meningkatkan kemampuan antibakteri dan degradasi biofilm *S. mutans* tetapi menurunkan kemampuan penghambatan pembentukan biofilm. Komposisi optimum campuran minyak atsiri tersebut adalah 27:73 (% v/v). Hasil tersebut menunjukkan potensi campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kayu manis untuk dikembangkan sebagai antiplak gigi.

Kata kunci : daun cengkeh, kulit batang kayu manis, *Streptococcus mutans*

Abstract

Dental plaque is a mouth cavity health problem related to microbial biofilm, where *Streptococcus mutans* is predominant. Adding of essential oils blend in mouthwash has been reported to increase the dental plaque inhibitory activity. The essential oils of clove leaves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) and cinnamon cortex (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.), are known as potential antibacterial and antibiofilm towards *S. mutans*. This research aims were to reveal the influence of blending the clove leaves and cinnamon cortex essential oils in antibacterial and anti biofilm activity against *S. mutans* and to find out the optimum composition. Antibacterial assay was performed in nutrient broth media, on *microplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Biofilm formation inhibition and degradation assays were done in *BHI + 2 % sucrose* on *microplate flexible U-bottom PVC 96 wells*. *Crystal violet 1 %* was used to stain

the biofilm and *Optical Density (OD)* was measured at λ 595 nm. *Simplex Lattice Design* formula was used to calculate the blend optimum composition. TLC-bioautography and GC-MS assays were done to reveal the active substances. As conclusion, it was proven that blending the clove leaves and cinnamon cortex essential oils increased the antibacterial and biofilm degradation potency, but reduced the biofilm formation inhibitory effect against *S. mutans*. The optimum composition of the essential oils blend was 27:73 (% v/v). From our results we suggest that the clove leaves and cinnamon cortex essential oil blend used in this study be developed as anti dental plaque.

Key words : clove leaves, cinnamon cortex, essential oils blend, *Streptococcus mutans*

Pendahuluan

Salah satu masalah tentang kesehatan mulut dan gigi, yaitu plak gigi, disebabkan adanya pembentukan biofilm oleh mikroba mulut (Marsh, 2006). Jika hal ini dibiarkan, maka akan terjadi penumpukan plak di gigi sehingga mengurangi estetika. Selain itu, plak gigi juga dapat bersifat patologis di antaranya menyebabkan karang gigi dan karies (Jellinek, 1970). Bakteri yang berperan dominan dalam pembentukan plak dan perkembangan karies adalah *Streptococcus mutans* (Shulman *et al.*, 1994; Zickert *et al.*, 1983).

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa minyak atsiri dari daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) dan kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.) memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm dengan kandungan aktif antibakteri pada minyak atsiri cengkeh yaitu senyawa eugenol, sedangkan kandungan aktif antibakteri pada minyak atsiri kayu manis yaitu senyawa fenol (Hertiani *et al.*, 2009). Pada hasil penelitian yang lain dikemukakan bahwa penambahan kombinasi minyak atsiri pada sediaan *mouthwash* dapat meningkatkan aktivitas penghambatan plak-biofilm (Pan *et al.*, 2003; Ouhayoun, 2003). Zat antimikroba jika digunakan dalam bentuk kombinasi memiliki beberapa keuntungan yaitu melalui efek sinergisme atau adisi, mengurangi kemungkinan terjadinya resistensi selain dapat meningkatkan efektivitas pengobatan, terutama jika kedua zat tersebut memiliki

mekanisme aksi yang berbeda tetapi saling mendukung (Li and Tang, 2004).

Hal di atas melatarbelakangi penelitian untuk mengetahui pengaruh campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis terhadap aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap *S. mutans*. Penentuan komposisi optimum campuran minyak atsiri tersebut dilakukan dengan menggunakan metode *Simplex Lattice Design (SLD)* (Bolton, 1997).

Metodologi

Bahan

Daun cengkeh segar (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) diperoleh dari daerah Manesrenggo (Klaten, Jawa Tengah) dan kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.) diperoleh dari daerah Tawangmangu (Karanganyar, Jawa Tengah). Identifikasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM dengan nomor registrasi voucher spesimen 0184/T.Tb./VI/2010. Bahan dicuci bersih dengan air mengalir dan dikecilkan ukuran partikelnya, kemudian disuling dengan metode penyulingan air dan uap selama \pm 6 jam. Minyak atsiri yang dihasilkan dihitung rendemen, dianalisis organoleptis dan indeks biasanya dengan refraktometer Abbe (Gunther, 1987).

Kultur *S. mutans* ATCC 21752 diperoleh dari PAU Pangan Gizi, UGM. Bahan untuk KLT bioautografi adalah adalah plat silika gel F 254 *pre coated*, toluen, dan etil asetat (masing-masing berderajat *pro analyses*, Merck, Darmstadt, Jerman), *Nutrien Broth* (Oxoid), Bacteriological Agar (Bacto).

Alat

Microplate reader Benchmark Biorad (Tokyo, Jepang), *chamber* untuk KLT, lampu UV 254 dan 366, pipet mikro Socorex® (0,5 – 10; 5–50; 50-200, 200–1000 µL), pipet mikro *multi chanel* (20 – 200 µL), alat KG-SM Shimadzu QP2010S (Kyoto, Jepang), autoklaf, alat destilasi uap dan uap air, refraktometer Abbe (Atago, Jepang), oven, labu takar, jangka sorong, mikroplat *flat-bottom* and *flexible U-bottom* PVC 96 wells, alat alat gelas, piring petri, inkubator, *Laminar Air Flow chamber*.

Uji antibakteri kombinasi minyak atsiri

Uji dilakukan dengan metode mikrodilusi pada *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Pengujian dilakukan terhadap minyak atsiri cengkeh, kayu manis tunggal dan campuran, masing-masing pada kadar 0,002% v/v dalam media *NB (Nutrient Broth)* dan suspensi bakteri dengan volume total 100 µL tiap *well*. Komposisi campuran kedua minyak atsiri yang diuji yaitu 75% cengkeh:25% kayu manis, 50% cengkeh:50% kayu manis, dan 25 % cengkeh:75% kayu manis. Pelarut yang digunakan yaitu metanol dengan kadar 0,0013 % v/v dari total suspensi uji. Sedangkan suspensi bakteri *S. mutans* yang digunakan setara standar McFarland II ($6,0 \times 10^8$ CFU/mL) yaitu sebanyak 10 % v/v dari total suspensi uji. Kontrol positif digunakan produk *moutwash "L"* dengan kadar 1% v/v dari total suspensi uji. Suspensi uji kemudian diinkubasi pada suhu $\pm 36,6^\circ$ C selama 18-24 jam. Pembacaan *Optical Density (OD)* dilakukan dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, UGM. Uji antibakteri ini dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

Uji penghambatan pembentukan biofilm kombinasi minyak atsiri

Pengujian dilakukan seperti pada pengujian antibakteri, hanya saja media yang digunakan adalah *BHI + sukrosa 2%* pada *microtiterplate flexible U bottom*, dan suspensi bakteri *S. mutans* yang digunakan setara standar McFarland V ($15,0 \times 10^8$ CFU/mL) sebanyak 10% v/v dari total suspensi uji. Suspensi uji selanjutnya diinkubasi pada suhu $\pm 36,6^\circ$ C selama 18-24 jam. Setelah masa inkubasi, *microplate* dicuci menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali, kemudian ditambahkan 125 µL larutan *CV 1%* ke tiap *well* dan diinkubasi

pada suhu ruang selama 15 menit. Setelah itu, *microplate* dicuci kembali dengan cara yang sama seperti sebelumnya, yaitu dengan air mengalir sebanyak tiga kali. Larutan etanol 96% sebanyak 200 µL ditambahkan ke dalam tiap *well* dan dilakukan inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 150 µL larutan dari tiap *well* dipindahkan ke *microplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Pembacaan *Optical Density (OD)* dilakukan dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm, replikasi tiga kali (O'Toole and Kolter, 1998).

Uji kemampuan degradasi biofilm kombinasi minyak atsiri

Pengujian ini dilakukan sebagaimana penghambatan pertumbuhan biofilm (cara kerja point 4) hanya saja suspensi sampel uji ditambahkan pada biofilm yang telah berumur 24 jam. Biofilm terbentuk setelah sebelumnya masing-masing *wells* diinkubasi selama 24 jam dengan suspensi bakteri dalam media *BHI + sukrosa 2 %*. Setelah terbentuknya biofilm, suspensi dalam *microplate* tersebut dibuang, kemudian ditambahkan 100 µL suspensi uji yang terdiri atas minyak atsiri dalam metanol, dan media *BHI + sukrosa 2 %*. Kontrol positif digunakan produk *moutwash "L"* dengan kadar 1% v/v dari total suspensi uji. Suspensi uji selanjutnya diinkubasi pada suhu $\pm 36,6^\circ$ C selama 18-24 jam. Setelah masa inkubasi, *microplate* dicuci menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali, dan seterusnya sebagaimana dilakukan pada uji penghambatan pembentukan biofilm (O'Toole and Kolter, 1998).

Uji verifikasi persamaan SLD dan penentuan komposisi optimum campuran minyak atsiri

Uji verifikasi dilakukan dengan membandingkan secara statistik data prosen penghambatan yang diperoleh dari pengujian dan yang diperoleh dari hasil perhitungan menggunakan persamaan *SLD* yang diperoleh dari rumus sebagai berikut: $Y = a(A) + b(B) + ab(AB)$ (1); dimana Y=% penghambatan, A = komposisi minyak atsiri temulawak, B = komposisi minyak atsiri cengkeh, a=koefisien minyak atsiri temulawak, b=koefisien minyak atsiri cengkeh, ab=koefisien minyak atsiri temulawak dan cengkeh ($A+B = 1$) (Bolton, 1997).

Penentuan komposisi optimum dilakukan berdasarkan harga R_{total} optimum, yang diperoleh dari penjumlahan daya anti bakteri, penghambatan pertumbuhan biofilm dan degradasi biofilm (Bolton, 1997).

Uji KLT-bioautografi (Gibbons and Gray, 1998)

Masing-masing 2 μL minyak atsiri cengkeh 1% v/v dan kayu manis 1% v/v dalam toluen diaplikasikan pada tiga plat KLT. Satu plat digunakan untuk uji antibakteri (bioautografi), sedangkan plat yang lain digunakan untuk analisis fitokimia (KLT). Fase diam dalam sistem kromatografi yang digunakan pada uji ini yaitu silika gel 60 F₂₅₄, sedangkan fase geraknya yaitu toluen:etil asetat dengan perbandingan 93:7 v/v, jarak elusi \pm 8 cm (Wagner dan Bladt, 2001). Selanjutnya, plat KLT diangin-anginkan agar sisa solven hilang. Setelah kering, plat uji antibakteri ditempelkan pada media padat NA (*Nutrient Agar*) yang telah mengandung 10% v/v suspensi bakteri *S. mutans* setara McFarland II ($6,0 \times 10^8$ CFU/mL). Proses penempelan plat pada media padat NA ini dilakukan selama 1 jam, dilanjutkan inkubasi pada suhu \pm 36,6°C selama 18-24 jam. Pengamatan dilakukan secara visual. Komponen senyawa aktif ditunjukkan dengan adanya bercak pada plat KLT yang dapat memberikan hambatan pertumbuhan bakteri berupa zona jernih di sekitar bercak tersebut. Zona jernih kemudian diukur diameternya dan dicatat juga harga *Rf*-nya. Pengamatan terhadap dua plat KLT untuk analisis fitokimia dilakukan dengan sinar UV₂₅₄, UV₃₆₆, dan sinar tampak, sedangkan deteksinya menggunakan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat (dengan pemanasan pada suhu \pm 120° C selama 5 menit), FeCl₃, dan 2,4-DNPH (pada minyak atsiri kayu manis) (Wagner and Bladt, 2001).

Uji Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa (KG-SM)

Pemeriksaan komponen minyak atsiri daun cengkeh dan minyak atsiri kulit batang kayu manis dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Gadjah Mada. Kondisi operasi dari alat KG-SM yaitu menggunakan jenis kolom HP-5MS dengan panjang 30 meter dan *ID (Inside Diameter)* 0,25 mm, suhu kolom 80–270° C,

jenis pengionan *EI (Electron Impact)* 70 Ev, gas pembawa helium 16,5 kPa, injeksi dengan cara *split* pada suhu 290°C, dan detektor spektrometer massa.

Cara Analisis

Rumus yang digunakan untuk menghitung persen penghambatan adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(OD_{\text{sampel}} - OD_{\text{blanko sampel}})}{(OD_{\text{vehicle}} - OD_{\text{blanko vehicle}})} \right) \times 100\% \quad (3)$$

(dimodifikasi dari Quave dkk., 2008)

Keterangan : *OD* sampel: *Optical Density* minyak atsiri + suspensi bakteri; *OD* blanko sampel: *OD* minyak atsiri + saline; *OD vehicle*: *OD* kontrol *vehicle* (metanol) + suspensi bakteri; *OD* blanko *vehicle*: *OD* kontrol *vehicle* (metanol) + saline. Program statistik SPSS 12.0 digunakan untuk analisis statistik *Shapiro Wilk*, *Test of Homogeneity of Variances*, *One-Way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test (Tukey HSD)* (taraf kepercayaan 95%). Hasil uji verifikasi persamaan *SLD* dianalisis secara statistik menggunakan metode *One-Sample T-Test* (taraf kepercayaan 95%) dengan program statistik SPSS 12.0.

Hasil dan Pembahasan

Minyak atsiri yang diperoleh dari hasil destilasi adalah sebagaimana tercantum pada tabel I. Hasil optimasi komposisi campuran minyak atsiri cengkeh dan kayu manis ditunjukkan pada Tabel II yang menunjukkan bahwa persen daya antibakteri tertinggi adalah pada komposisi campuran minyak cengkeh:kayu manis (50:50 v/v); persen penghambatan pembentukan biofilm tertinggi pada komposisi (0:100 v/v); dan persen kemampuan degradasi biofilm tertinggi yaitu pada komposisi (50:50 v/v).

Persamaan garis yang diperoleh dari perhitungan *SLD* terhadap daya anti bakteri (penghambatan pertumbuhan planktonik bakteri) dan kemampuan degradasi biofilm, berturut-turut adalah $Y = 14,13A + 12,47B + 70,944AB$; $Y = 79,85A + 86,45B + 37,184AB$. Kurva hasil perhitungan persen penghambatan

Tabel I. Karakteristik minyak atsiri hasil destilasi

Parameter	Minyak atsiri daun cengkeh	Minyak atsiri kulit batang kayu manis
Rendemen	3,2% ml/g	0,13% ml/g
Warna	kecoklatan	kuning
Bau	aromatik khas cengkeh	aromatik khas kayu manis
Rasa	pedas, getir	manis
Indeks bias	1,528	1,512

Tabel II. Hasil pengujian efek kombinasi minyak atsiri cengkeh dan kayu manis terhadap daya antibakteri dan antibiofilm *S. mutans*

Sampel	% Daya antibakteri	% Penghambatan Pertumbuhan Biofilm	% Degradasi Biofilm
Cengkeh	14,13 ± 8,97	7,65 ± 5,05	79,85 ± 3,41
C75:K25	15,48 ± 9,82	19,55 ± 9,78	90,24 ± 7,07
C50:K50	42,73 ± 8,56	25,75 ± 5,01	95,34 ± 1,74
C25:K25	26,03 ± 11,29	53,07 ± 5,85	87,12 ± 3,83
Kayu manis	12,47 ± 10,73	79,95 ± 7,90	86,45 ± 2,59

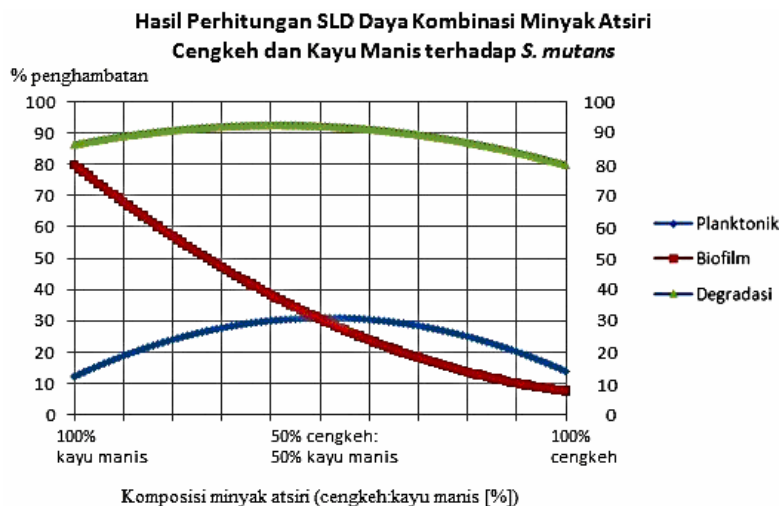
Keterangan: C = Cengkeh; K = Kayu manis; SD = deviasi standar; n = 3

dengan persamaan *SLD* (Gambar 1.) menunjukkan kurva melengkung ke bawah yang berarti bahwa pencampuran kedua minyak atsiri (cengkeh dan kayu manis) meningkatkan aktivitas antibakteri dan kemampuan degradasi biofilm *S. mutans* dibandingkan masing-masing minyak atsiri tunggalnya.

Persamaan garis yang diperoleh dari penghambatan pembentukan biofilm adalah $Y = 7,64A + 79,95B - 52,848AB$. Kurva hasil perhitungan persen penghambatan dengan persamaan *SLD* (Gambar 1) menunjukkan bentuk diagonal ke atas yang berarti bahwa pencampuran kedua minyak atsiri (cengkeh dan kayu manis) menurunkan kemampuan penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* dibandingkan minyak atsiri kayu manis tunggalnya. Semakin besar komposisi minyak atsiri kayu manis dalam campuran maka semakin tinggi kemampuan penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans*, tetapi peningkatan komposisi minyak atsiri cengkeh dalam campuran menurunkan kemampuan penghambatan.

Verifikasi terhadap persamaan *SLD* yang diperoleh pada penelitian ini dilakukan dengan menguji campuran minyak atsiri pada komposisi cengkeh dan kayu manis 30:70 (% v/v). Hasil yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan metode *One-Sample T-Test* (Tabel III), yang menunjukkan bahwa perhitungan menggunakan persamaan *SLD* dapat menggambarkan hasil uji yang sebenarnya dan persamaan tersebut juga dapat digunakan untuk menghitung komposisi campuran minyak atsiri optimum.

Optimasi komposisi campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis dalam penelitian ini dilakukan terhadap 3 jenis pengujian, yaitu: uji daya antibakteri, uji penghambatan pembentukan biofilm, dan degradasi biofilm *S. mutans*. Penentuan komposisi campuran minyak atsiri optimum diperoleh dari penjumlahan respon antibakteri (R_1); penghambatan pembentukan biofilm (R_2); dan degradasi biofilm (R_3) dengan pembobotan sebagaimana persamaan berikut:



Gambar 1. Kurva hasil perhitungan *SLD* daya antibakteri dan antibiofilm kombinasi minyak atsiri cengkeh dan kayu manis terhadap *S. mutans*.

$R_1 = N_1 \times 0,35$; $R_2 = N_2 \times 0,3$; $R_3 = N_3 \times 0,35$; dan $N = \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X_{min}}$ (2) (Bolton, 1997), dimana R_1 = persen daya antibakteri; R_2 = persen penghambatan pembentukan biofilm dan R_3 = persen kemampuan degradasi biofilm. X_{min} untuk R_1 adalah: 12,47 sedangkan $X_{max} = 100$; X_{min} untuk R_2 adalah 7,64, dan $X_{max} = 100$; X_{min} untuk R_3 adalah 79,85, dan $X_{max} = 100$. Parameter persen daya antibakteri dan kemampuan degradasi biofilm diberi bobot lebih tinggi yaitu 0,35 dibandingkan persen penghambatan pembentukan biofilm (0,3). Perbedaan pembobotan didasarkan pengaruh dari masing-masing parameter terhadap respon total yang diperoleh, semakin besar pengaruhnya, semakin besar pula pembobotannya.

Hasil perhitungan R_{total} berbagai macam komposisi campuran minyak atsiri cengkeh dan kayu manis menunjukkan bahwa campuran minyak atsiri dengan komposisi cengkeh dan kayu manis 27:73 (% v/v) memiliki harga R_{total} paling besar yaitu: 0,406319. Oleh karena itu, komposisi tersebut ditentukan sebagai komposisi

optimum campuran minyak atsiri cengkeh dan kayu manis. Berdasarkan kurva perhitungan *SLD* (Gambar 1), terlihat juga bahwa proporsi minyak atsiri kayu manis dalam campuran memberikan respon lebih besar dibandingkan minyak atsiri cengkeh. Dengan demikian, minyak atsiri yang memberikan pengaruh lebih dominan terhadap respon antibakteri dan antibiofilm *S. mutans* adalah minyak atsiri kayu manis.

Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-bioautografi dan KG-SM

Hasil pengujian KLT-bioautografi (Tabel IV) menunjukkan bahwa kandungan minyak atsiri cengkeh yang aktif sebagai antibakteri *S. mutans* adalah senyawa fenol (*hRf* 56, diameter hambatan 6,0 mm) Bercak aktif ini merupakan eugenol yang merupakan senyawa mayor dalam minyak atsiri cengkeh dengan kadar relatif tertinggi seperti ditunjukkan pada hasil pemeriksaan KG-SM sebesar 77,85% (Gambar 2 dan Tabel IV).

Hasil pengujian KLT-bioautografi menunjukkan bahwa kandungan minyak atsiri kayu manis yang aktif sebagai

Tabel III. Analisis statistik hasil verifikasi persamaan *sld* campuran minyak atsiri cengkeh dan kayu manis (Tarf Kepercayaan 95%, n=3)

Jenis Pengujian	% Penghambatan		Signifikansi	Hasil Analisis Statistik
	Hasil Perhitungan	Hasil Pengujian		
Daya antibakteri	27,8662	28,02 ± 0,22	0,349	Tidak berbeda Signifikan
Penghambatan pembentukan biofilm	47,1589	46,98 ± 4,54	0,952	Tidak berbeda Signifikan
Kemampuan degradasi biofilm	92,2786	92,30 ± 0,34	0,923	Tidak berbeda Signifikan

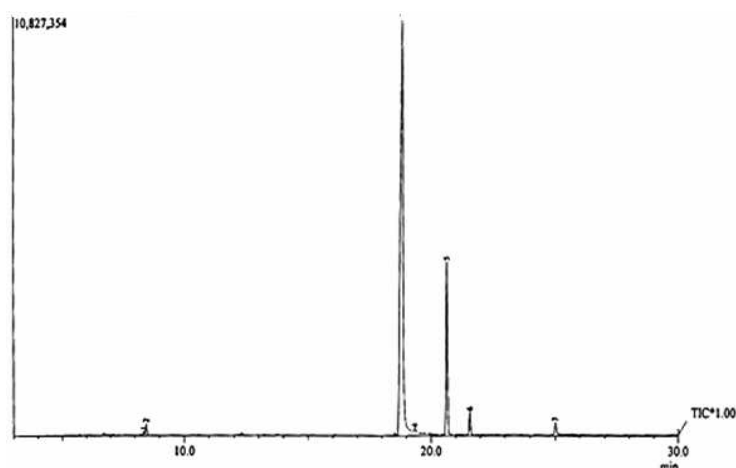
Tabel IV. Profil KLT dan bioautografi minyak atsiri cengkeh dan minyak atsiri kayu manis

Sampel	<i>hRf</i>	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Perubahan Warna			Diameter hambatan (mm)	Kemungkinan senyawa
				Vanilin H ₂ SO ₄	FeCl ₃	2,4-DNPH		
Cengkeh	14	√	-	-	-	tidak dideteksi	-	tidak diketahui
	56	√	-	Coklat	Biru kehitaman	-	6,0	Fenol
Kayu	22	√	-	-	-	-	-	tidak diketahui
Manis	58	√	-	-	-	Kuning oranye	5,0	Aldehida
	64	√	-	Coklat	Biru kehitaman	-	5,0	Fenol
	69	√	-	-	-	-	-	tidak diketahui

Keterangan: √ = terjadi pemadaman fluoresensi pada bercak; Fase diam = silika gel 60 F₂₅₄; fase gerak = toluena:etil asetat (93:7 % v/v)

antibakteri *S. mutans* dimungkinkan merupakan senyawa fenol (*hRf* 64, diameter hambatan 5,0 mm). Selain itu, hasil pengujian bioautografi ini juga menunjukkan bahwa kandungan minyak atsiri kayu manis, selain fenol, yang aktif sebagai antibakteri *S. mutans* dimungkinkan merupakan senyawa aldehida (sinamal-dehida, *hRf* 58, diameter hambatan 5,0 mm) yang merupakan senyawa mayor dalam minyak atsiri kayu manis (Gambar 3 dan Tabel V). Berdasarkan hasil tersebut dapat

dikatakan bahwa minyak atsiri kayu manis memiliki dua senyawa aktif antibakteri yaitu fenolik dan sinamal-dehida. Aktivitas campuran minyak atsiri dalam meningkatkan kemampuan antibakteri kemungkinan disebabkan kandungan senyawa fenolik dan aldehida dapat merusak protein sel bakteri secara lebih efektif, sehingga mengacaukan membran sel ataupun menginaktifkan enzim-enzim tertentu (Siswandono and Soekardjo, 1995; Davidson *cit* Celikel and Kavas, 2008).



Gambar 2. Kromatogram minyak atsiri cengkeh hasil analisis KG-SM

Keterangan: kondisi operasional: jenis kolom HP-5MS dengan panjang 30 meter dan *ID (Inside Diameter)* 0,25 mm, suhu kolom 80–270° C, jenis pengionan *EI (Electron Impact)* 70 Ev, gas pembawa helium 16,5 kPa, injeksi *split* pada suhu 290° C, detektor spektrometer massa; Library: WILEY 7.LIB.; n = 1.

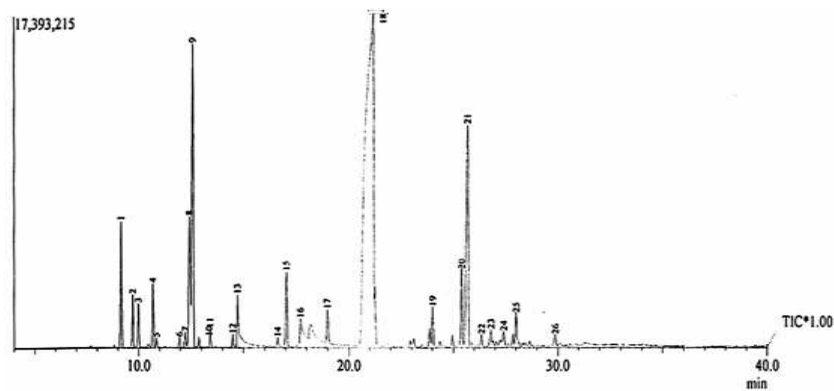
Tabel V. Hasil KG-SM minyak atsiri daun cengkeh

Jenis Senyawa	Retention time	Luas Area (%)
eugenol ^{*)}	18,85	77,85
β -kariofilena	20,65	17,36
α -humulena	21,57	2,11
kariofilena oksida	25,01	1,23
α -kopaena	19,35	0,26

^{*)} kemungkinan terdapat puncak senyawa isoeugenol dengan kadar relatif (persentase luas area) sangat kecil (Parthasarathy *et al.*, 2008)

Selain senyawa golongan fenilpropanoid (seperti eugenol dan sinamaldehida), minyak atsiri cengkeh dan minyak atsiri kayu manis juga mengandung senyawa golongan terpenoid hidrokarbon (seperti α -pinena dan limonena). Senyawa tersebut dapat terakumulasi dalam jaringan lipid membran sel bakteri, dan menyebabkan terganggunya struktur dan fungsi dari membran sel disebabkan oleh ekspansi (pembengkakan) membran sel dan perubahan permeabilitas membran sel bakteri (Sikkema *et al.*, 1994).

Hasil uji penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* menunjukkan bahwa minyak cengkeh, minyak kayu manis serta campurannya berpotensi menghambat pembentukan biofilm. Niu dan Gilbert (2004) menyatakan bahwa senyawa eugenol dan senyawa sinamaldehida memiliki aktivitas antibiofilm. Kemampuan senyawa-senyawa fenolik dan aldehid untuk menginaktifkan enzim bakteri (Davidson *cit* Celikel and Kavas, 2008; Ouhayoun, 2003; Siswandono and Soekardjo, 1995), kemungkinan menyebabkan terhambatnya



Gambar 3. Kromatogram minyak atsiri kayu manis hasil analisis KG-SM

Keterangan: kondisi operasional: jenis kolom Rastek RXi-5MS dengan panjang 30 meter dan *ID* (*Inside Diameter*) 0,25 mm, suhu kolom 80°C–280°C, jenis pengionan *EI* (*Electron Impact*) 70 Ev, gas pembawa helium 16,5 kPa, injeksi *split* pada suhu 290°C, detektor spektrometer massa; Library: WILEY 7.LIB.; n = 1.

Tabel VI. Hasil KG-SM minyak kulit batang kayu manis

Jenis Senyawa	<i>Retention time</i>	Luas Area (%)
Sinamaldehyda	21,17	54,30
1,8-sineol	12,60	9,59
sinamil asetat	25,69	9,58
α -pinena	9,16	2,90
Limonena	12,44	4,38
β -kariofilena	25,40	2,32
Hidrosinamaldehyda	17,04	2,06

aktivitas enzim glukosiltransferase yang digunakan *S. mutans* untuk mensintesis sukrosa dalam media menjadi glukosa. Akibatnya, pembentukan biofilm juga menjadi terhambat karena glukosa (sebagai media pelekatan bakteri) jumlahnya sedikit atau terbatas. Pembentukan biofilm juga dapat dihambat komunikasi mikroba atau penghambatan *quorum sensing*. Menurut Khan *et al.*, (2008), minyak cengkeh dan minyak kayu manis mempunyai aktivitas sebagai anti-*quorum sensing* pada bakteri. Hal ini memberikan dugaan bahwa potensi kedua minyak tersebut dalam menghambat pembentukan biofilm disebabkan aktivitas anti-*quorum sensing*.

Hasil uji penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* menunjukkan bahwa campuran minyak cengkeh dan minyak kayu manis menurunkan kemampuan penghambatan pembentukan biofilm jika dibandingkan minyak kayu manis dalam keadaan tunggalnya, tetapi meningkatkan kemampuan tersebut jika dibandingkan minyak cengkeh dalam keadaan tunggalnya. Interaksi yang terjadi pada campuran minyak atsiri cengkeh dan kayu manis pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh adanya hubungan antara jumlah senyawa lipofil yang terkandung dalam minyak atsiri dan kelarutan senyawa aktif minyak atsiri dalam media dengan mekanisme aksinya.

Lipofilisitas dan solubilitas senyawa aktif ini sangat berpengaruh terhadap aktivitas antimikroba. Hal ini telah dibuktikan oleh Cox *et al.*, (2001) dalam penelitiannya mengenai interaksi antar komponen dalam minyak atsiri *Melaleuca alternifolia*. Efek indifferen (antagonisme) dalam minyak atsiri terjadi akibat adanya penghalangan aktivitas senyawa aktif oleh senyawa non-aktif dalam minyak atsiri. Peningkatan konsentrasi senyawa non-aktif dapat menurunkan konsentrasi senyawa aktif yang terlarut dalam media, yang selanjutnya menyebabkan penurunan aktivitas dari senyawa aktif dalam minyak atsiri tersebut.

Berdasarkan hasil uji kemampuan degradasi biofilm *S. mutans*, diketahui bahwa kombinasi minyak cengkeh dan minyak kayu manis dapat meningkatkan kemampuan degradasi biofilm dibandingkan minyak cengkeh dan minyak kayu manis dalam keadaan tunggalnya. Hal ini kemungkinan karena kandungan senyawa dalam kedua minyak tersebut mempunyai

aksi yang sama yaitu dapat menghilangkan lapisan eksopolisakarida pada biofilm.

Kesimpulan

Kombinasi minyak atsiri daun cengkeh dan minyak atsiri kulit batang kayu manis meningkatkan daya antibakteri dan degradasi biofilm *S. mutans*, tetapi menurunkan kemampuan penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* dibandingkan minyak atsiri kayu manis tunggalnya, dan komposisi optimum yang diperoleh dari metode *SLD* adalah campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis 27:73 (% v/v).

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini merupakan bagian dari skripsi M. Ardani (Fakultas Farmasi UGM, Supervisor: T. Hertiani) dan didanai oleh Hibah Penelitian Berkualitas Prima Fakultas Farmasi UGM 2008 No. UGM/FA/606a/M/05/01.

Daftar Pustaka

- Bolton, S., 1997, *Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications*, 3rd Ed., Marcell-Dekker Inc. New York, 590-625.
- Cox, S. D., Mann, C. M., and Markham, J. L., 2001, Interactions between Components of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia*, *Journal of Applied Microbiology*, 91 (3), 492-497.
- Davidson, P. M., 2001, Chemical Preservatives and Naturally Antimicrobial Compounds *cit* Celikel, N. and Kavas, G., 2008, Antimicrobial Properties of Some Essential Oils Against Some Pathogenic Microorganisms, *Czech J. Food Sci.*, 26 (3), 174-181.
- Gibbons, S., and Gray, A. I., 1998, Isolation by Planar Chromatography. In: Cannell, R.J.P. (Ed.), *Natural Product Isolation*, Totowa, Humana Press, New Jersey, 209-245.
- Guenther, E., 1987, *Minyak Atsiri*, Jilid I. Diterjemahkan oleh Ketaren, S., UI Press, Jakarta, 170-183, 296-297
- Hertiani, T., Pratiwi, S. U. T., and Kuswahyuning, R., 2009, Eksplorasi Minyak Atsiri sebagai Alternatif Bahan Aktif Pasta Gigi Anti Plak Berdasarkan Aktivitas Antibakteri dan Inhibitor Biofilm pada *Streptococcus mutans* secara In Vitro, *Laporan Penelitian Program Hibah Penelitian Berkualitas Prima*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Jellinek, J. S., 1970, *Formulation and Function of Cosmetics*, diterjemahkan oleh Fenton, G.L., John Wiley Intescince, New York, 261.

- Khan, M. S., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F.M., and Ahmad, I, 2009, Inhibition of Quorum Sensing Regulated Bacterial Functions by Plant Essential Oils with Special Reference to Clove Oil, *Letters in Applied Microbiology*, 49 (3), 354-60.
- Li, R. C. and Tang, M. C., 2004, Post-Antibiotic Effect Induced by an Antibiotic Combination: Influence of Mode, Sequence and Interval of Exposure, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 904-908.
- Marsh, P., 2006, Dental Plaque as a Biofilm and a Microbial Community – Implications for Health and Disease, *BMC Oral Health*, 6 (Suppl 1), 514.
- Niu, C. and Gilbert, E. S., 2004, Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components that Affect Biofilm Formation and Structure, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 6951-6956.
- O'Toole, G. and Kolter, R., 1998, Initiation of Biofilm Formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Proceeds via Multiple, Convergent Signaling Pathways: A Genetic Analysis, *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.
- Ouhayoun, J. P., 2003, Penetrating the Plaque Biofilm: Impact of Essential Oil Mouthwash, *J. of Clinical Periodontology*, 30 (Suppl 5), 10-12.
- Pan, P. H., Finnegan, M. B., Sturdivant, L., and Barnett, M. L., 2003, Comparative Antimicrobial Activity of an Essential Oil and an Amine Fluoride/Stannous Fluoride Mouthrinse In Vitro, *J. of Clinical Periodontology*, 26 (7), 474-476.
- Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., and Bennett, B. C., 2008, Effects of Extracts from Italian Medicinal Plants on Planktonic Growth, Biofilm Formation and Adherence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *J. of Ethnopharmacology*, 118 (3), 418-428.
- Shulman, S.T., Phair, J.P., Sommers, H.M., 1994, *Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi*, diterjemahkan oleh Wahab, A.S., Edisi IV, 152-158, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B., 1994, Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membran, *The J. of Biological Chemistry*, 269 (11), 8022-8028.
- Siswandono and Soekardjo, B., 1995, *Kimia Medisinal*, Airlangga Press, Surabaya, 249-259.
- Wagner, H., and Bladt, S., 2001, *Plant Drug Analyses: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin, 149-191
- Zickert, I., Emilson, C. G., and Krasse, B., 1983, Correlation of Level and Duration of *Streptococcus mutans* Infection with Incidence of Dental Caries, *Infection and Immunity*, 39(2), 982-985.

*) korespondensi : Triana Hertiani
Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada,
Sekip Utara, Yogyakarta
Email : hadna3ana@yahoo.com