



**EFEK ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN CENGKEH
(*Syzygium aromaticum*) TERHADAP *Escherichia coli* DAN
*Staphylococcus aureus***

**Antibacterial Effect of Clove Leaf Extract (*Syzygium aromaticum*) against
Escherichia coli and *Staphylococcus aureus***

Ardia Ramadhani¹, Susy Saadah², Sogandi^{1*}

¹Program Studi Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta
Jalan Sunter Karya, Sunter, Jakarta Utara, DKI Jakarta 14350

²Jurusan Analisis Farmasi dan Makanan, Poltekkes Kemenkes Jakarta II
Jalan Hang Jebat III/F3 Kebayoran Baru, DKI Jakarta 12120

*Email: sogandi@uta45jakarta.ac.id

ABSTRACT

Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* are microorganisms that cause infection. Overcoming infection using antibiotics is known to generate bacteria that are resistant to some antibiotics, hence the need of other antibacterial resources. One of the natural sources that can be utilized is clove leaf (*Syzygium aromaticum*). This study aims to determine the types of compounds contained in clove leaves and their inhibitory activity against *E. coli* and *S. aureus*. The study began with extraction using maceration techniques, then the separation of the compounds through ethanol, *n*-hexane, and ethyl acetate fractionation. Next step was the identification of secondary metabolites of clove leaf compounds using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The results showed the ethyl acetate fraction was the most active in inhibiting the growth of *E. coli* and *S. aureus* with a minimum inhibitory value (MIC) of 10%. The most dominant compound in the ethyl acetate fraction was found to be caffeine with a content of 23.36%.

Keywords: antibacterial, clove leaves, GC-MS, MIC, *Syzygium aromaticum*

ABSTRAK

Escherichia coli dan *Staphylococcus aureus* adalah mikroorganisme penyebab infeksi. Penanggulangan infeksi menggunakan antibiotik telah memunculkan bakteri yang resisten terhadap beberapa antibiotik sehingga perlu mencari sumber antibakteri lain. Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan adalah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Penelitian ini bertujuan mengetahui jenis senyawa yang terkandung dalam daun cengkeh dan aktivitas penghambatannya terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Penelitian diawali dengan ekstraksi menggunakan teknik maserasi, kemudian dilakukan pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran melalui fraksinasi etanol, *n*-heksan, dan etil asetat. Hasil fraksinasi diujikan ke bakteri uji. Identifikasi senyawa metabolit sekunder daun cengkeh menggunakan Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat paling aktif menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan nilai kadar hambat minimum (KHM) 10%. Senyawa paling dominan pada fraksi etil asetat adalah kafein dengan kadar 23,36%.

Kata Kunci: antibakteri, daun cengkeh, GC-MS, KHM, *Syzygium aromaticum*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi atau penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme merupakan penyakit yang banyak ditemukan pada masyarakat. Menurut laporan WHO tahun 2015 penyakit infeksi merupakan penyebab kematian terbesar pada anak-anak dan orang dewasa dengan jumlah kematian lebih dari 13 juta jiwa setiap tahun, serta menempati urutan kedua (25%) setelah kematian yang disebabkan oleh penyakit kardiovaskular (31%) dari 53,9 juta kasus penyebab kematian di dunia dan menjadi penyebab kematian utama pada anak dibawah umur 4 tahun. Beberapa penyakit infeksi yang sering dialami oleh masyarakat antara lain penyakit infeksi kulit dan diare. Penyakit diare dapat disebabkan oleh *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

E. coli adalah bakteri Gram negatif yang merupakan penyebab kedua infeksi setelah *Streptococcus*. Meningitis yang disebabkan *E. coli* menyebabkan kematian hingga 20-40% pada bayi yang terinfeksi (Alam 2011). Selain meningitis, diare juga merupakan penyebab kedua kematian pada anak umur di bawah lima tahun dan menjadi penyebab kematian sekitar 760.000 anak setiap tahun, disamping itu terdapat 1,7 miliar kasus diare tiap tahunnya (WHO 2017). *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang dapat ditemukan dimana saja termasuk pada tubuh manusia. Pada tubuh manusia, jika bakteri ini dalam jumlah normal maka tidak berpotensi menimbulkan penyakit. Studi epidemiologi menunjukkan bahwa infeksi akibat *S. aureus* di dunia meningkat dalam dua dekade terakhir. Data di Amerika Serikat dan Eropa menunjukkan bahwa *S. aureus* merupakan bakteri patogen yang paling banyak menjadi penyebab infeksi dengan prevalensi 18-30%. Sedangkan di Asia, *S. aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* memiliki prevalensi yang hampir sama banyak (Mehraj et al. 2014).

Permasalahan infeksi yang disebabkan oleh bakteri *E. coli* dan *S. aureus* ini dapat diatasi dengan cara mencari alternatif dari bahan alami yang memiliki sifat antibakteri. Pentingnya untuk mencari sumber antibiotik alami adalah karena saat ini sudah banyak

ditemukan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik seperti dilaporkan oleh Tan et al. (2014) bahwa 85,71% bakteri *E. coli* resisten terhadap penicillin dan chloramphenicol, sedangkan bakteri *S. aureus* memiliki resistensi sebesar 72,30% terhadap ampicillin, 53,38% terhadap penicillin, 4,73% terhadap nitrofurantoin, dan 1,35% terhadap chloramphenicol sehingga menjadi masalah. Masalah resistensi bakteri ini dapat diatasi dengan mencari sumber antibakteri yang berasal dari alam. Salah satu tanaman yang sudah banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat tradisional dan penyedap masakan adalah pohon cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

Daun cengkeh (Gambar 1) diketahui memiliki banyak khasiat, diantaranya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus* mutans (Suhendar dan Sogandi 2019), selain itu ekstrak daun cengkeh juga dapat meningkatkan limfosit dan berat limpa pada mencit (Wael et al. 2018). Penelitian tentang ekstrak dari daun cengkeh telah banyak dilakukan, namun penelitian yang membahas mengenai aktivitas ekstrak dan fraksi dari daun cengkeh dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*, penentuan nilai kadar hambat minimum (KHM), dan identifikasi jenis senyawa bioaktif dari hasil fraksinasi ekstrak daun cengkeh perlu diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun cengkeh terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, serta mengidentifikasi jenis senyawa bioaktifnya sebagai antibakteri.



Gambar 1. Daun cengkeh kering

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, pada bulan Mei–Agustus 2018.

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh segar yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) Bogor, etanol 70%, etanol 96% p.a., *Nutrient Broth* (Merck), *Nutrient Agar* (Merck), aquades p.a., kapas, ampicillin (Thermo), kultur bakteri *E. coli* ATCC 25922, kultur bakteri *S. aureus* ATCC 25323.

Pembuatan serbuk simplisia

Simplisia daun cengkeh yang diperoleh dari BALITTRO disortir terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada simplisia. Setelah itu dilakukan perajangan untuk mempermudah dalam proses pengeringan. Pengeringan dilakukan selama 3 hari dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah proses pengeringan selesai, bahan simplisia kering dihaluskan, disaring dan diayak dengan tujuan untuk memperluas permukaan kontak antara partikel dengan cairan penyari sehingga hasil ekstraksi lebih maksimal (Suhendar dan Sogandi 2019).

Ekstraksi daun cengkeh

Ekstraksi yang dilakukan adalah ekstraksi bertingkat dengan menggunakan dua macam pelarut yaitu n-heksan (nonpolar), etil asetat (semi polar). Serbuk simplisia sebanyak 1.000 g diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan direndam dalam 5 L etanol 70% (v/v). Proses maserasi selama 3 x 24 jam dan dilakukan pengadukan sesekali, lalu disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh lalu dipekatkan dengan *vacuum rotary* evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*) etanol daun cengkeh berupa pasta, kemudian dihitung rendemen ekstrak berdasarkan metode Wael et al. (2018).

Skrining fitokimia daun cengkeh

Skrining fitokimia meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid, serta senyawa fenol. Seluruh

pemeriksaan senyawa tersebut dilakukan menggunakan metode yang digunakan dalam penelitian sebelumnya (Rajendrabhai 2017).

Pemeriksaan alkaloid menggunakan tiga pereaksi, yaitu pertama pereaksi Mayer dengan menambahkan 3 tetes ekstrak daun cengkeh dan 2 tetes pereaksi Mayer, yang jika terbentuk endapan putih atau kuning menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Kedua dengan pereaksi Bouchardat yaitu menambahkan 3 tetes ekstrak daun cengkeh dan 2 tetes pereaksi Bouchardat, yang jika terbentuk endapan coklat sampai hitam menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Ketiga yaitu dengan pereaksi Dragendorff dilakukan dengan menambahkan 3 tetes ekstrak daun cengkeh dan 2 tetes pereaksi Dragendorff, bila terbentuk endapan jingga sampai merah coklat atau merah bata menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Ekstrak dinyatakan mengandung senyawa alkaloid jika sedikitnya 2 dari 3 pereaksi tersebut memberikan hasil positif (Rajendrabhai 2017).

Untuk pemeriksaan flavonoid, ekstrak daun cengkeh sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 10 mL air panas. Campuran dididihkan dan disaring dalam keadaan panas. Selanjutnya filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan dengan 0,1 g serbuk Mg, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Bila terbentuk warna kuning, orange atau merah pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Rajendrabhai 2017).

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan memasukkan 1 g ekstrak daun cengkeh ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas 10 mL, dikocok selama 15 menit. Bila setelah ditetesi asam klorida 2 N terbentuk buih permanen selama kurang lebih 10 menit maka memberikan indikasi adanya saponin.

Untuk pemeriksaan tanin, 1 g ekstrak daun cengkeh ditambah dengan 10 mL air suling, dihomogenkan dan disaring. Selanjutnya 2 mL filtrat ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin.

Pemeriksaan steroid dan triterpenoid dilakukan dengan menambahkan asam asetat glasial sebanyak 5 tetes dan asam sulfat pekat sebanyak 2 tetes pada 30 mg ekstrak daun cengkeh. Ekstrak mengandung steroid jika terbentuk warna biru atau hijau sedangkan ekstrak mengandung triterpenoid jika

memberikan warna merah atau ungu.

Pada pemeriksaan senyawa fenol, 3 mL larutan ekstrak dibagi 2, yaitu larutan A dan B. Larutan A sebagai blanko sedangkan larutan B direaksikan dengan besi (III) klorida 10%, timbulnya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan ada kandungan fenol.

Fraksinasi ekstrak

Ekstrak daun cengkeh yang diperoleh dilarutkan dengan etanol 70% dan air dengan perbandingan 3:1, kemudian difraksinasi dengan n-heksan 100 mL. Lapisan n-heksan dipisahkan dengan cara dituang dari corong pisah ke labu Erlenmeyer dan dipekatkan. Fraksi air yang diperoleh kemudian difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat (Asmara 2017).

Aktivitas antibakteri

Suspensi bakteri uji didapat dengan cara menginokulasi satu ose kultur bakteri ke dalam medium *nutrient broth* (NB), dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Biakan kemudian diencerkan ke dalam NaCl 0,9% dengan perbandingan 1:9 untuk mendapatkan konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL, kemudian 3 mL biakan bakteri ditambahkan dengan 17 mL medium *nutrient agar* (NA) dan dituangkan ke dalam cawan petri. Kertas cakram direndam ke dalam larutan ekstrak daun cengkeh dengan kontrol positif ampicillin (10 mg mL^{-1}), dan kontrol negatif akuades. Kemudian kertas cakram ditempelkan pada permukaan media agar, didiamkan selama 30 menit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (*triplo*) dan zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (Suhendar dan Sogandi 2019).

Kadar hambat minimum (KHM)

Kadar hambat minimum dilakukan menggunakan metode dilusi cair dengan menggunakan media cair *nutrient broth* (NB). Sebanyak 5 mL media NB steril dalam masing-masing tabung reaksi ditambahkan dengan 1 ose bakteri uji, kemudian ditambahkan ekstrak dengan konsentrasi 5% (b/v), 10% (b/v), 15% (b/v), 20% (b/v), dan 25% (b/v). Larutan dalam tabung reaksi tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm, selanjutnya tabung diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C

dalam inkubator *shaker*. Setelah diinkubasi, absorbansi larutan diukur kembali (Sogandi dan Nilasari 2019).

Analisis kebocoran protein dan asam nukleat

Analisis kebocoran protein dan asam nukleat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dan pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 260 nm untuk asam nukleat dan 280 nm untuk protein. Suspensi bakteri uji yang sudah diinkubasi selama 24 jam sebanyak 10 mL disentrifus pada kecepatan $10.000 \times$ gravitasi selama 10 menit. Endapan sel bakteri yang diperoleh kemudian dicuci menggunakan buffer fosfat pH 7,0 dan diulang pencucian selama 2 kali. Endapan sel disuspensikan dalam 5 mL larutan buffer fosfat pH 7,0, ditambahkan ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi akhir setara dengan 1 KHM (10% b/v) dan 2 KHM (20% b/v), diinkubasi kembali dalam *shaker* inkubator pada kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil kultur bakteri disentrifus pada kecepatan $10.000 \times$ gravitasi selama 10 menit, selanjutnya supernatan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan blanko yang digunakan adalah media NB (Amelia dan Sogandi 2020).

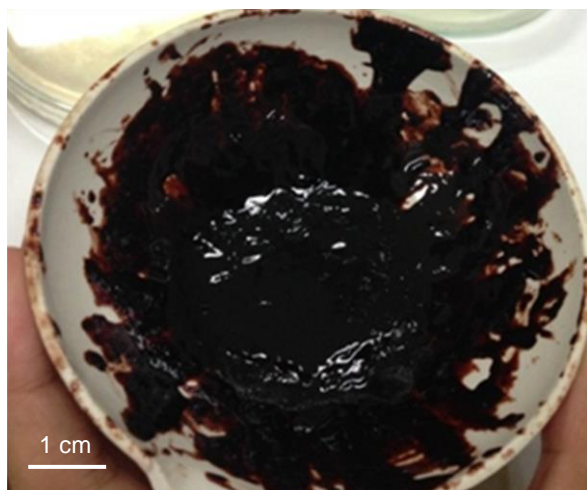
Analisis GC-MS

Identifikasi senyawa dari ekstrak daun cengkeh menggunakan GC-MS (Shimadzu GCMS-QP 2010 Ultra) bertempat di laboratorium kesehatan daerah DKI Jakarta. Fase diam yang digunakan adalah Rxi-1MS (100% *dimethyl polysiloxane*) yang memiliki panjang kolom 30 cm dan berdiameter 0,25 mm. Gas pembawa helium dikondisikan pada tekanan 37,1 kPa, dengan volume injeksi sebanyak 5 μ L, 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 (Suhendar et al. 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi daun cengkeh

Simplisia daun cengkeh diekstraksi dengan metode maserasi yang memiliki keuntungan antara lain murah, mudah



Gambar 2. Ekstrak Etanol daun cengkeh

dilakukan dengan alat-alat sederhana, dan cara penarikan zat aktif yang tidak menggunakan pemanasan sehingga tidak merusak zat aktif yang terkandung dalam daun cengkeh. Serbuk simplisia dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% b/v. Karena sifatnya lebih selektif, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, dan panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih rendah (Asmara 2017).

Sebanyak 1.000 g serbuk daun cengkeh dimaserasi dengan cara direndam menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 5 L dibantu pengadukan dengan batang pengaduk selama 1 jam. Tujuannya adalah agar cairan penyari dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel. Setelah direndam selama satu hari dengan etanol 70% maka pemisahan antara serbuk yang terendam dengan pelarut (maserat) menggunakan kertas saring, kemudian dilakukan remaserasi sebanyak 4 kali dan didiamkan selama satu hari dengan tujuan untuk memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa berkhasiat yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Kemudian dilakukan pemekatan dengan cara penguapan atau evaporasi cairan pelarut dengan alat *rotary*. Kemudian ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui rendemennya (Gambar 2).

Proses ekstraksi daun cengkeh menghasilkan ekstrak kental sebanyak 100,08 g dari 1.000 g serbuk kering daun cengkeh, kemudian dihitung nilai rendemennya dan didapatkan nilai sebesar 10,05% (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil pengamatan ekstrak etanol daun cengkeh

Pengamatan	Hasil
Rendemen	10.05%
Organoleptis:	
- Bentuk	ekstrak kental
- Warna	cokelat kemerahan
- Rasa	pahit
- Bau	khas cengkeh

Tabel 2. Kandungan senyawa fitokimia daun cengkeh

Senyawa Fitokimia	Fraksi			
	Etanol	Heksan	Etil Asetat	Air
Alkaloid	+	+	+	+
Flavonoid	+	-	-	-
Saponin	+	+	+	-
Tanin	+	-	-	-
Steroid	+	+	+	+
Triterpenoid	+	+	+	-
Fenolik	+	+	-	-

Identifikasi senyawa fitokimia

Hasil positif alkaloid (Tabel 2) pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih 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 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 (Chowdaiah et al. 2019).

Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Pada pembuatan reaksi Dragendorff, bismuth nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismuth mudah terhidrolisis membentuk ion bismutil

(BiO^+). Agar Bi^{3+} tetap berada dalam larutan, maka larutan itu ditambah asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri. Selanjutnya ion Bi^{3+} dari bismuth nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam bismuth (III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam (Chowdaiah et al. 2019).

Hasil positif selanjutnya adalah uji saponin. Saponin bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti air. Busa yang dihasilkan pada uji saponin disebabkan karena adanya glikosida yang dapat membentuk busa dalam air dan terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Rajendrabhai 2017).

Identifikasi terpenoid dan steroid pada ekstrak etanol daun cengkeh memberikan hasil positif dengan terbentuknya cincin coklat pada batas antara kloroform dan H_2SO_4 , selain itu ketika ditambahkan 2 mL asam sulfat terlihat perubahan warna hijau menjadi warna hijau pekat. Perubahan warna ini disebabkan oleh 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 hidrogen. Gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas sehingga mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan adanya cincin coklat (Rajendrabhai 2017).

Identifikasi flavonoid menunjukkan warna jingga atau orange yang berarti positif adanya flavonoid. Magnesium dan asam klorida bereaksi membentuk gelembung-gelembung yang merupakan gas H_2 . Sedangkan logam Mg dan HCl pekat pada uji ini 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 (Pardede et al. 2013).

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 et al. 2013).

Fraksinasi ekstrak etanol

Fraksinasi dimulai dengan menimbang ekstrak etanol sebanyak 5 g yang dilarutkan ke dalam etanol 70% sebanyak 75 mL dan air 25 mL. Kemudian difraksinasi dengan pelarut n-heksan 100 mL dan dilakukan sebanyak lima kali pengulangan yang bertujuan agar senyawa metabolit sekunder benar-benar bisa terpisah. Berdasarkan hasil fraksinasi diperoleh dua lapisan, yaitu lapisan atas berwarna hijau dan lapisan bawah berwarna coklat. Lapisan bawah ini merupakan fraksi etanol, ini terjadi karena massa jenis n-heksan ($0,654 \text{ g mL}^{-1}$) lebih kecil daripada massa jenis etanol ($0,789 \text{ g mL}^{-1}$), kemudian fraksi n-heksan yang terdapat pada lapisan atas dipisahkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Berat rendemen dari fraksi n-heksan yang diperoleh adalah 5,40 g. Fraksi etanol difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat. Berdasarkan hasil fraksinasi diperoleh dua lapisan, yaitu lapisan bawah adalah air dan lapisan atas berwarna merah kecoklatan adalah etil asetat. Pemisahan tersebut terjadi karena berat jenis air $0,998 \text{ g mL}^{-1}$ lebih berat dari etil asetat yang memiliki berat jenis $0,902 \text{ g mL}^{-1}$ (de Melo et al. 2017). Berat fraksi etil asetat yang diperoleh adalah sebesar 8,24 g.

Aktivitas antibakteri

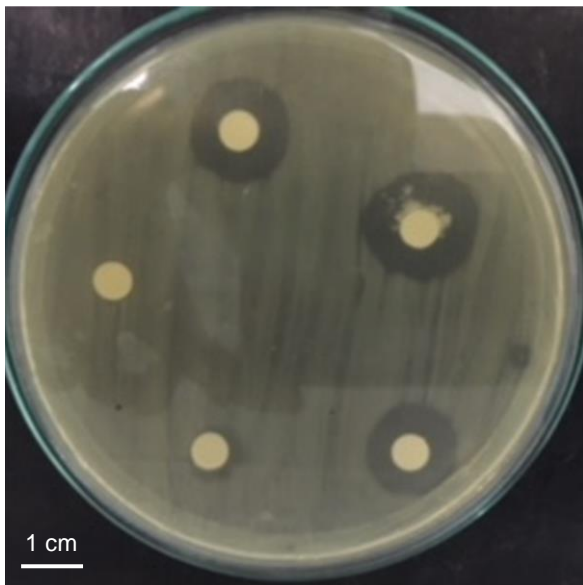
Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun cengkeh (*S. aromaticum*) terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* menggunakan metode difusi cakram karena difusi cakram relatif sederhana dan pengerjaannya cepat serta paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan terhadap berbagai macam bakteri (Gambar 3 dan 4).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap tiga perlakuan yaitu dengan menggunakan ekstrak etanol daun cengkeh, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat diperoleh zona hambat yang berbeda-beda dan dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk. Zona hambat yang terbentuk disebabkan karena adanya zat-zat aktif pada daun cengkeh yang mengandung senyawa yang bersifat antibakteri yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan fenol (Nwokocha et al. 2012). Berdasarkan hasil pengukuran (Tabel 3) dapat dilihat bahwa kontrol positif yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, sedangkan pada kontrol negatif tidak terjadi pertumbuhan bakteri.

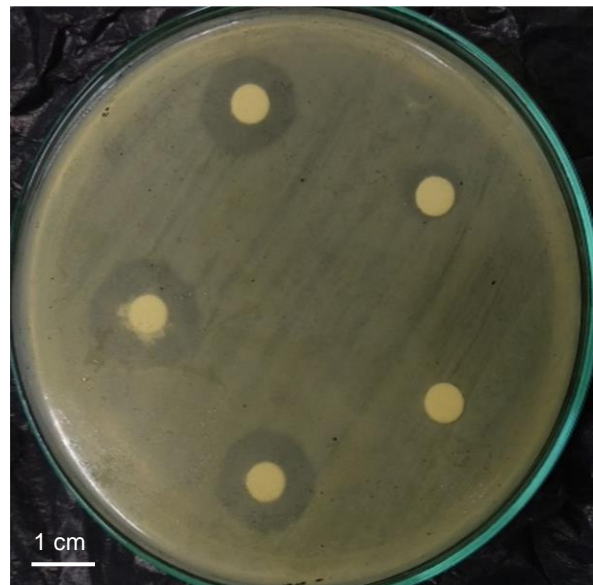
Penelitian ini menggunakan kontrol positif ampicillin. Ampicillin adalah antibiotik yang bersifat bakterisidal yang mekanismenya menghambat pembentukan dinding sel dengan mengikat protein sehingga menyebabkan dinding sel terhambat dan sel

akan pecah (lisis). Mekanisme yang terjadi diawali dengan pemutusan ikatan C-N pada cincin beta-laktam dan mengakibatkan antibiotik tidak dapat berikatan dengan protein transpeptidase sehingga terjadi kehilangan kemampuan untuk menghambat pembentukan dinding sel bakteri (Ahsan et al. 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Abdullah dan Kumar (2019) menunjukkan bahwa ampicillin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan diameter zona hambat 25 mm. Selanjutnya penelitian yang dilakukan oleh Nworu dan Esimone (2006) juga menunjukkan bahwa kombinasi antara ampicillin dan ciprofloxacin memberikan efek sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

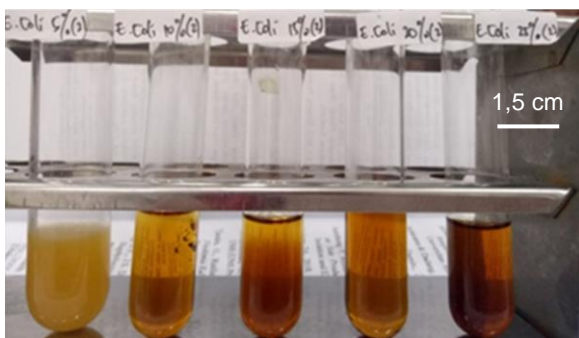
Hasil selanjutnya, fraksi etil asetat daun cengkeh memiliki zona hambat terbesar, yaitu 17,41 mm untuk bakteri *E. coli* dan 17,37 mm untuk *S. aureus*. Ekstrak etanol memiliki zona hambat sebesar 16,07 mm dan



Gambar 3. Aktivitas terhadap *Escherichia coli*



Gambar 4. Aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*



Gambar 5. Penentuan nilai kadar hambat minimal (KHM)

Tabel 4. Hasil pengukuran KHM fraksi etil asetat daun cengkeh

Konsentrasi Sampel	Rata-Rata Absorbansi (λ 600 nm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
5%	0.224 ± 0.009	0.279 ± 0.029
10%	0.030 ± 0.032	0.074 ± 0.011
15%	0.072 ± 0.037	0.060 ± 0.017
20%	0.038 ± 0.064	0.035 ± 0.022
25%	0.046 ± 0.072	0.021 ± 0.027

Tabel 5. Kebocoran protein dan asam nukleat

λ (nm)	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	Kontrol Uji	1 KHM	2 KHM	Kontrol Uji	1 KHM	2 KHM
260	0,37	3,58	3,60	0,40	3,48	3,58
280	0,34	3,48	3,58	0,39	3,43	3,50

16,73 mm untuk bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Sedangkan fraksi n-heksan hanya memiliki zona hambat masing-masing sebesar 13,61 mm dan 15,25 mm untuk bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Sehingga dari hasil pengujian aktivitas antibakteri ini, fraksi etil asetat daun cengkeh dilanjutkan untuk analisis selanjutnya yaitu penentuan nilai kadar hambat minimum (KHM), analisis kebocoran sel, dan analisis GC-MS.

Hasil uji kadar hambat minimum (KHM)

Pengujian konsentrasi hambat minimum dilakukan menggunakan sampel hasil fraksinasi dengan pelarut etil asetat. Berdasarkan pengujian nilai KHM (Tabel 4 dan Gambar 5) yang dilakukan pada konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25% terlihat bahwa pada konsentrasi 5% masih terdapat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tingginya nilai absorbansi baik pada bakteri *E. coli* maupun *S. aureus*. Sementara itu, pada konsentrasi 10% nilai absorbansi turun secara signifikan menjadi 0,030 pada bakteri *E. coli* dan 0,074 pada bakteri *S. aureus*. Hal ini menandakan bahwa sudah tidak adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi ekstrak 10%. Hasil uji kadar hambat minimum yang diperoleh dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat daun cengkeh memiliki aktivitas yang baik untuk menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa ekstrak daun cengkeh memberi pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* (Suhendar dan Sogandi 2019).

Analisis kebocoran sel

Pemberian fraksi etil asetat pada bakteri sesuai dengan KHM mengakibatkan terjadinya kebocoran sel yang diamati dengan adanya kebocoran metabolit sekunder seperti asam nukleat dan protein. Kebocoran komponen ini dapat diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Dari

pengujian diperoleh hasil bahwa adanya peningkatan absorbansi yang terbaca antara nilai KHM 1 dan KHM 2 (Tabel 5).

Menurut Papuc et al. (2017), adanya kebocoran sel pada bakteri uji diduga karena adanya kandungan senyawa fenolik pada fraksi. Senyawa fenolik akan bereaksi dengan komponen fosfolipid dari membran sel yang menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas membran sel sehingga komponen intraseluler seperti asam-asam amino, asam nukleat serta protein akan keluar.

Peningkatan nilai absorbansi untuk asam nukleat dan protein pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm antara kontrol, KHM 1 dan KHM 2 menunjukkan terjadinya kebocoran pada sitoplasma. Hal ini sesuai dengan pernyataan Romha et al. (2018) bahwa semakin tinggi konsentrasi KHM yang diberikan maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang terdeteksi atau semakin meningkat pula kebocoran asam nukleat maupun protein yang terjadi. Senyawa fenolik dapat berfungsi sebagai bahan antibakteri karena adanya gugus OH yang bersifat racun terhadap bakteri dan semakin banyak gugus OH yang ada pada senyawa tersebut maka semakin beracun bagi bakteri (Miklasinska-Majdanik 2018).

Senyawa antibakteri dapat menghambat sintesa dinding sel dan merusak membran sel. Adanya kerusakan membran sel maka akan memudahkan asam-asam organik berpenetrasi ke membran sitoplasma dan menyebabkan perubahan kestabilan dinding yang akhirnya akan menyebabkan kebocoran ion.

Hasil analisis GC-MS

Hasil GC-MS menunjukkan bahwa di dalam fraksi etil asetat daun cengkeh terdapat beberapa senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri (Tabel 6 dan Gambar 6). Hasil penelitian Munira et al. (2020)

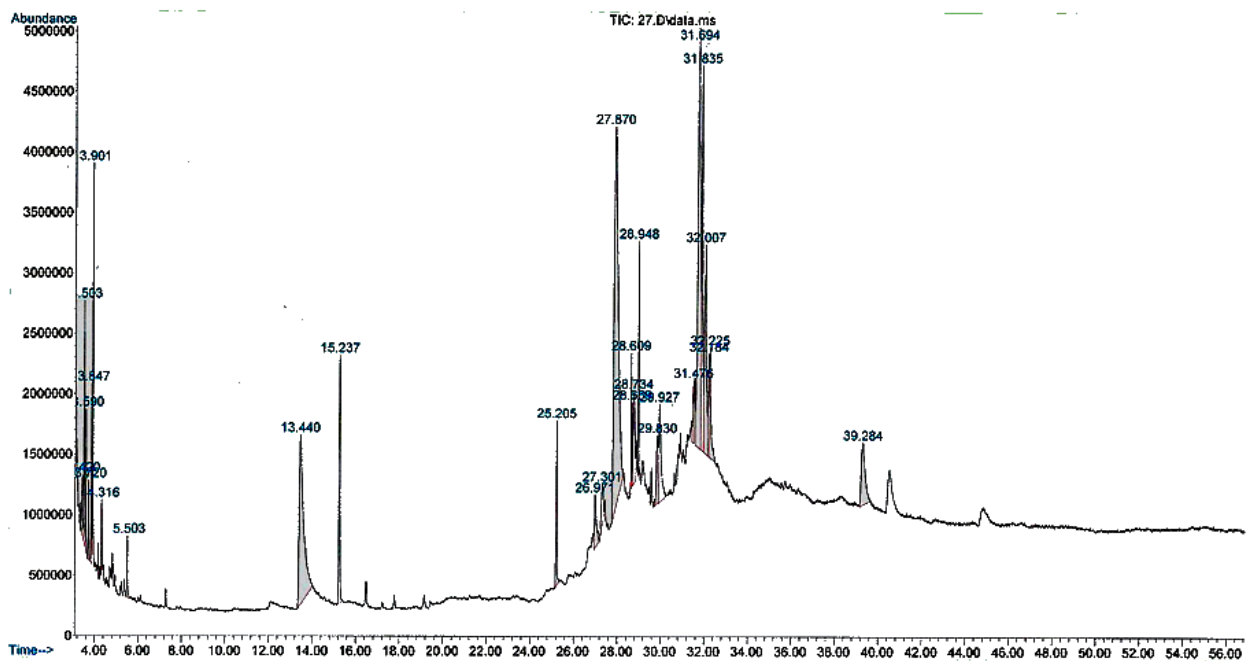
membuktikan bahwa kafein dari ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki aktivitas antibakteri *E. coli*. Menurut Ibrahim et al. (2006) senyawa kafein dapat mengendalikan *E. coli* strain O157. Kafein merupakan salah satu dari golongan alkaloid dan menurut Monente et al. (2015) mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Mekanisme lain antibakteri alkaloid yaitu komponen alkaloid diketahui sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri. Kemudian senyawa yang sering muncul adalah eugenol pada waktu retensi 13,473. Hasil penelitian membuktikan bahwa eugenol pada ekstrak bunga cengkeh (*S. aromaticum*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* (Besra dan Kumar 2018) dan bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Zhang et al. 2017). Eugenol yang terdapat pada fraksi daun cengkeh adalah turunan dari senyawa fenol. Menurut Bouarab-Chibane et al. (2019) mekanisme fenol sebagai agen antibakteri berperan sebagai toksin dalam protoplasma, merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri. Senyawa fenolik bermolekul besar mampu

menginaktifkan enzim esensial di dalam sel bakteri meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah. Fenol dapat menyebabkan kerusakan pada sel bakteri, denaturasi protein, menginaktifkan enzim dan menyebabkan kebocoran sel.

Pada waktu retensi 39,28 menit juga ditemukan adanya senyawa Stigmat-5-EN-3-OL (β -sitosterol). Senyawa ini juga diketahui memiliki aktivitas terhadap bakteri Gram positif, Gram negatif dan fungi. Senyawa β -sitosterol yang terdapat pada daun cengkeh merupakan senyawa turunan dari steroid. Menurut Ajiboye et al. (2016), mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid. Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga

Tabel 6. Hasil GC-MS fraksi etil asetat daun cengkeh

RT	Nama Senyawa	Kandungan (%)
27,869	Caffeine	23,36
31,696	i-propyl 9,12-Octadecanadenoate	15,90
13,437	Eugenol	11,08
31,833	2-Octadeenylsuccinicanhydride	7,08
32,006	Z-12-Pentacosene	5,66
39,280	Stigmas-5-en-3-ol	3,53



Gambar 6. Spektogram hasil GC-MS fraksi etil asetat daun cengkeh

menyebabkan integrasi membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis.

KESIMPULAN

Fraksi etil asetat daun cengkeh merupakan fraksi yang paling berpotensi sebagai antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dengan nilai KHM 10% dan zona hambat sebesar ± 17 mm melalui mekanisme aksi penghambatan yang diduga dengan membuat lubang pada membran sel bakteri. Penelitian ini juga mengungkapkan bahwa fraksi etil asetat daun cengkeh mengandung beberapa senyawa bioaktif dengan kandungan terbesarnya adalah senyawa kafein 23,36%. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk dapat menjadikan daun cengkeh sebagai sumber antibiotik alternatif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, dan LPPM Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta yang telah mendukung dan memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Abdullah A, Kumar Y (2019) Comparative study of antimicrobial activity of betel leaf extract and antibiotics against selected bacterial pathogens. *Int J Curr Microbiol App Sci* 8: 2009-2019. doi: 10.20546/ijcmas.2019.803.239

Ahsan T, Chen J, Wu Y, Irfan M, Shafi J (2017) Screening, identification, optimization of fermentation conditions, and extraction of secondary metabolites for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Biotechnol & Biotechnol Equip* 31: 91-98. doi: 10.1080/13102818.2016.1259016

Ajiboye TO, Mohammed AO, Bello SA, Yusuf II, Ibitoye OB, Muritala HF, Onajabi IB (2016) Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. *Microbial Pathogenesis* 95: 208-215. doi: 10.1016/j.micpath.2016.03.011

Alam A (2011) Kejadian meningitis bakterial pada anak usia 6-18 bulan yang menderita kejang demam pertama. *Sari*

Pediatri 13: 293-298. doi: 10.14238/sp13.4.2011.293-8

Amelia, Sogandi (2020) Potensi antibakteri ekstrak daun kluwih (*Artocarpus camansi* Blanco) terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Bacillus subtilis*. *J Ilmu Dasar* 21: 105-114. doi: 10.19184/jid.v21i2.11568

Asmara AP (2017) Uji fitokimia senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak metanol bunga turi merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers). *Al-Kimia* 5: 48-59 doi: 10.24252/al-kimia.v5i1.2856

Besra M, Kumar V (2018) In vitro investigation of antimicrobial activities of ethnomedicinal plants against dental caries pathogens. *3 Biotech* 8: 257. doi: 10.1007/s13205-018-1283-2

Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lanteri P, Clement Y, Leonard-Akkari L, Oulahal N, Degraeve P, Bordes C (2019) Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) Models. *Front Microbiol* 10: 829. doi: 10.3389/fmicb.2019.00829

Chowdaiah M, Sharma P, Dhamodhar P (2019) A study on phytochemicals from medicinal plants against multidrug resistant *Streptococcus mutans*. *Int J Peptide Res Therapeutics* 25: 1581-1593. doi: 10.1007/s10989-018-09801-3

de Melo VF, Araujo GS, Bispo JAC, Del Bianchi VL, de Carvalho GBM (2017) Effect of different concentrations of bush passion fruit pulp and temperature in the production of beer. *Afr J Biotechnol* 16: 1150-1158. doi: 10.5897/AJB2016.15613

Ibrahim SA, Salameh MM, Phetsomphou S, Yang H, Seo CW (2006) Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. *Food Chem* 99: 645-650. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.08.026

Mehraj J, Akmatov MK, Strompl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, Pieper DH, Medina E, Witte W, Pessler F, Krause G (2014) Methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in Northern Germany. *PLoS One* 9: e107973. doi: 10.1371/journal.pone.0107937

- Miklasinska-Majdanik M, Kepa M, Wojtyczka RD, Idzik D, Wasik TJ (2018) Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Int J Environ Res Public Health* 15: 2321. doi: 10.3390/ijerph15102321
- Monente C, Bravo J, Vitas AI, Arbillaga, De Pena MP, Cid C (2015) Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *J Functional Foods* 12: 365-374. doi: 10.1016/j.jff.2014.12.006
- Munira M, Mastura N, Nasir M (2020) Uji antibakteri kulit buah kopi (*Coffea arabica* L.) Gayo berdasarkan tingkat kematangan terhadap *Escherichia coli*. *Indones J Health Sci* 4: 84-90. doi: 10.24269/ijhs.v4i2.2640
- Nwokocha CR, Owu DU, McLaren M, Murray J, Delgoda R, Thaxter K, McCalla G, Young L (2012) Possible mechanisms of action of the aqueous extract of *Artocarpus altilis* (breadfruit) leaves in producing hypotension in normotensive Sprague-Dawley rats. *Pharm Biol* 50: 1096-1102. doi: 10.3109/13880209.2012.658113
- Nworu CS, Esimone CO (2006) Comparative evaluation of three in vitro techniques in the interaction of ampicillin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Trop J Pharm Res* 5: 605-611. doi: 10.4314/tjpr.v5i2.14638
- Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V, Stefan G (2017) Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 16: 1243-1268. doi: 10.1111/1541-4337.12298
- Pardede A, Manjang Y, Efdi M (2013) Skrining fitokimia ekstrak metanol dari kulit batang manggis (*Garcinia cymosa*). *Media Sains* 6: 60-66
- Rajendrabhai V (2017) Detection of phytochemical and pharmacological properties of crude extracts of *Tribulus terrestris* collected from tribal regions of Baglan (M.S.), India. *Int J Pharm Phytochem Res* 9: 508-511. doi: 10.25258/phyto.v9i4.8122
- Romha G, Admasu B, Gebrekidan TH, Aleme H, Gebru G (2018) Antibacterial activities of five medicinal plants in Ethiopia against some human and animal pathogens. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018: 2950758. doi: 10.1155/2018/2950758
- Sogandi, Nilasari P (2019) Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) and their antibacterial activity. *IOP Conf. Ser: Earth Environ Sci* 299: 012020. doi: 10.1088/1755-1315/299/1/012020
- Suhendar U, Fathurrahman M, Sogandi (2019) Antibacterial activity and mechanism of action of methanol extract from kasturi mango fruit (*Mangifera casturi*) on caries-causing bacterium *Streptococcus mutans*. *J Kimia Sains Aplikasi* 22: 235-241. doi: 10.14710/jksa.22.6.235-241
- Suhendar U, Sogandi (2019) Identifikasi senyawa aktif ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) sebagai inhibitor *Streptococcus mutans*. *Al-Kauniah* 12: 229-239. doi: 10.15408/kauniah.v12i2.12251
- Tan SL, Lee HY, Mahyudin NA (2014) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. *Food control* 44: 203-207. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.04.008
- Wael S, Mahulette F, Watuguly TW, Wahyudi D (2018) Pengaruh ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap limfosit dan makrofag mencit Balb/c. *Majalah Obat Tradisional* 23: 79-83. doi: 10.22146/mot.38474
- WHO (2015) WHO multi-country survey reveals widespread public misunderstanding about antibiotic resistance. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/16-11-2015-who-multi-country-survey-reveals-widespread-public-misunderstanding-about-antibiotic-resistance>. Diakses tanggal 12 Maret 2020
- WHO (2017) Diarrhoeal disease. World Health Organization. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>, Diakses 19 Mei 2020

Zhang Y, Wang Y, Zhu X, Cao P, Wei S, Lu Y (2017). Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M.

Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis* 113: 396-402. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.054