

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Identifikasi Simplisia Bunga Cengkeh

Bunga cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Merapi Farma, Yogyakarta, berupa simplisia kering. Kebenaran simplisia dibuktikan dengan identifikasi simplisia secara makroskopik dan mikroskopik yang mengacu pada ketentuan persyaratan simplisia dalam Materia Medika Indonesia jilid VI. Pengamatan makroskopik bertujuan untuk mengetahui morfologi, ukuran, dan warna dari simplisia yang diteliti, sedangkan pengamatan mikroskopik bertujuan untuk mengetahui unsur-unsur anatomi jaringan yang khas pada simplisia dengan mengamati fragmen-fragmen pengenal dari simplisia tersebut.

Hasil pengamatan makroskopik pada simplisia bunga cengkeh kering adalah bunga berwarna coklat kehitaman, kelopak bunga berjumlah 4 helai, tidak mekar, tetapi menutup, berbentuk bulat telur, hipantium berbentuk seperti tabung dan mengerucut pada ujungnya.

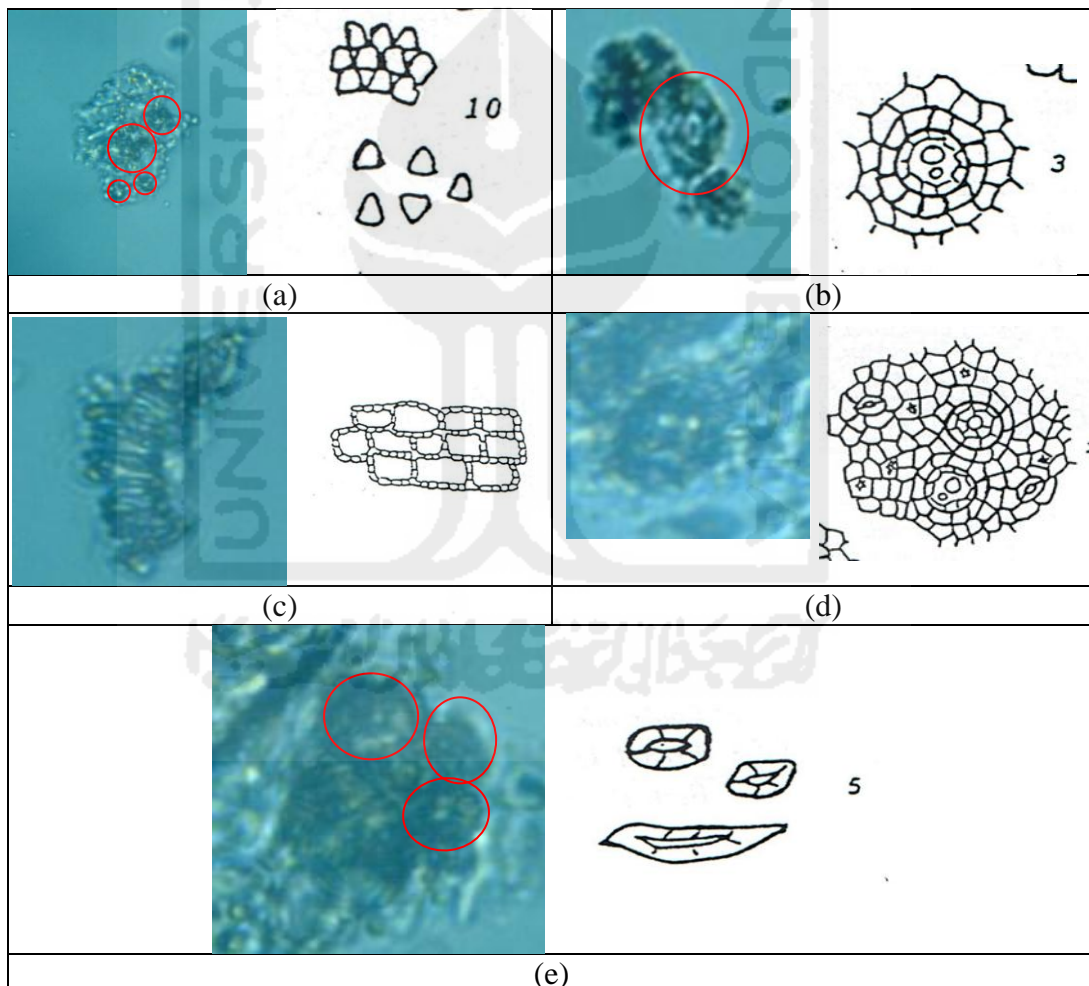


Gambar 4.1. Simplisia bunga cengkeh

Dalam Materia Medika Indonesia Jilid VI disebutkan bahwa ciri-ciri makroskopik bunga cengkeh adalah bunga panjangnya 10 mm sampai 17,5 mm; dasar bunga berisi 4, agak pipih, bagian atas meliputi bakal buah yang tenggelam, berongga 2 berisi banyak bakal buah melekat pada sumbu plasenta. Daun kelopak 4 helai tebal bentuk bundar telur atau segitiga, runcing, lepas. Daun mahkota 4 helai warna lebih muda dari warna kelopak, tidak mekar tipis seperti selaput,

saling menutup seperti susunan genting. Benang sari banyak berbentuk melengkung ke dalam; tangkai agak silinder segi empat panjangnya 2,5 mm sampai 4 mm⁽⁴⁰⁾. Hasil menunjukkan bahwa simplisia yang diteliti memiliki morfologi yang sesuai dengan ketentuan makroskopik bunga cengkeh pada *Materia Medika Indonesia Jilid VI*.

Hasil pemeriksaan mikroskopik fragmen pengenal dari simplisia bunga cengkeh dalam penelitian ini antara lain serbuk sari lepas, kelenjar minyak skizolisigen, berkas pembuluh dan serabut sklerenkim, epidermis dasar bunga, dan fragmen dasar bunga.



Gambar 4.2. Hasil pemeriksaan mikroskopik simplisia bunga cengkeh
 (a) serbuk sari lepas, (b) kelenjar minyak skizolisigen, (c) berkas pembuluh dan serabut sklerenkim, (d) epidermis dasar bunga, (e) sel batu dan sklereida

Dalam *Materia Medika Indonesia* Jilid VI disebutkan bahwa fragmen pengenal yang dimiliki oleh kulit bunga cengkeh antara lain; fragmen dasar bunga (hipantium), sel epidermis, stomata, kelenjar minyak skizolisigen, kepala sari dan serbuk sari berkelompok atau lepas, fragmen berkas pembuluh, fragmen serabut sklerenkim⁽⁴⁰⁾. Hasil menunjukkan bahwa simplisia bunga cengkeh yang diteliti memiliki fragmen pengenal yang sesuai dengan ketentuan mikroskopik bunga cengkeh pada *Materia Medika Indonesia* Jilid VI .

4.2. Hasil Destilasi Minyak Atsiri

Metode yang digunakan dalam isolasi minyak atsiri dari simplisia bunga cengkeh adalah dengan destilasi uap air. Metode ini digunakan karena minyak atsiri sangat mudah menguap dan tidak tahan pada pemanasan dengan suhu tinggi. Harris (1987) dalam Zulnely (2008) mengemukakan bahwa persentase senyawa yang terdapat dalam minyak hasil destilasi uap-air mempunyai nilai yang lebih besar dari pada minyak hasil destilasi air. Sehingga pada minyak hasil destilasi uap-air memiliki randemen yang lebih tinggi karena senyawa-senyawa yang terekstrak lebih banyak⁽⁴¹⁾. Dibandingkan dengan destilasi air, destilasi dengan uap-air lebih unggul karena proses dekomposisi minyak lebih kecil (hidrolisa ester, polimerisasi, resinifikasi, dan lain-lain). Pada destilasi air, beberapa jenis ester akan terhidrolisa sebagian, senyawa-senyawa yang peka seperti aldehid, mengalami polimerisasi karena pengaruh air mendidih⁽²⁸⁾.

Pada destilasi uap air, antara air dan minyak atsiri dalam bunga cengkeh tidak menguap secara bersama-sama. Pada awalnya air akan menguap setelah proses pemanasan dilakukan, setelah mencapai suatu keseimbangan tekanan tertentu, maka uap air akan masuk ke dalam jaringan dalam bunga cengkeh dan mendesak minyak atsiri ke permukaan. Kemudian minyak atsiri akan ikut menguap bersama uap air menuju kondensor jatuh masuk ke dalam labu penampung. Pada labu penampung, fase air dan fase minyak akan terpisah karena perbedaan berat jenis kedua fase tersebut. Fase air berada di bawah dan fase minyak berada di atas karena berat jenis air lebih besar daripada minyak. Minyak atsiri cengkeh yang dihasilkan masih berwarna kuning keruh, karena masih

mengandung sedikit air yang terdispersi dalam minyak tersebut. Untuk mengatasi hal ini, minyak bunga cengkeh dimasukkan ke dalam flakon dan ditambahkan Na_2SO_4 untuk memisahkan air dari minyak.

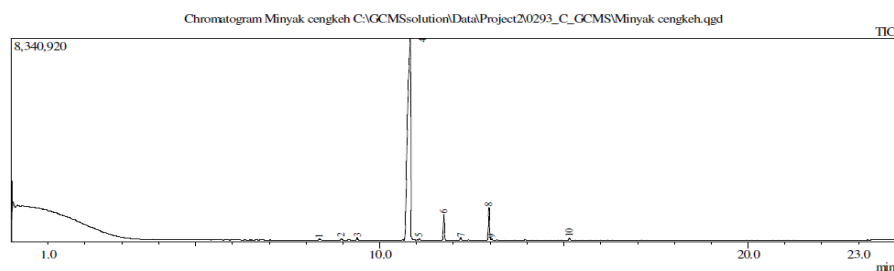


Gambar 4.3. Minyak atsiri bunga cengkeh

Perolehan volume minyak atsiri dari destilasi 1 kg simplisia bunga cengkeh selama 4 jam adalah 8,6 mL. Minyak atsiri yang dihasilkan berwarna kuning pucat dan berbau aromatis kuat. Perhitungan rendemen dilakukan untuk mengetahui perbandingan bobot simplisia yang digunakan dengan hasil minyak atsiri yang diperoleh. Hasil rendemen yang didapat pada minyak atsiri bunga cengkeh yaitu 0,86%.

4.3. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa dengan GC-MS

Identifikasi kandungan senyawa minyak atsiri dengan menggunakan GC-MS bertujuan untuk mengetahui persentase kandungan senyawa minyak bunga cengkeh. Analisis dengan GC-MS menghasilkan 2 macam data, yaitu hasil analisis GC berupa kromatogram dan hasil analisis MS berupa spektra massa. Hasil kromatogram GC minyak atsiri bunga cengkeh menunjukkan adanya 10 puncak.



Gambar 4.4. Kromatogram GC-MS minyak atsiri kulit bunga cengkeh

Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat 10 kandungan senyawa dalam minyak atsiri bunga cengkeh dengan komponen senyawa utama antara lain eugenol (87,92%), β -caryophyllene (4,16%), dan eugenyl asetat (5,50%). Menurut Nassar *et al.* (2007), minyak atsiri bunga cengkeh memiliki 16 kandungan senyawa dengan kandungan utama antara lain eugenol (71,56%), β -caryophyllene (1,67%), dan eugenyl asetat (8,99%)⁽⁴²⁾. Sedangkan menurut Alma *et al.* (2007), minyak atsiri bunga cengkeh memiliki 18 kandungan senyawa dengan kandungan utama eugenol (87%), β -caryophyllene (3,56%), dan eugenyl asetat (8,01%)⁽⁴³⁾. Pada penelitian Memmou dan Mahboub (2012), bunga cengkeh segar didistilasi dan dihasilkan minyak cengkeh dengan kandungan terbesar adalah eugenol (47,57%), β -caryophyllene (35,42%), serta eugenyl asetat (13,42%)⁽⁴⁴⁾. Perbedaan kadar senyawa-senyawa dalam minyak atsiri bunga cengkeh tersebut disebabkan oleh daerah tempat tumbuh, kondisi iklim, umur panen, preparasi bunga cengkeh sebelum distilasi, perbedaan lama waktu distilasi, perbedaan metode isolasi, serta cara penyimpanan minyak⁽⁴⁵⁾.

Tabel 4.1. Hasil analisis komponen kimia minyak atsiri bunga cengkeh

No.	R.Time	% Area	Nama Senyawa
1.	10,830	87,92	eugenol
2.	11,738	4,16	β -caryophyllene
3.	12,962	5,50	eugenyl asetat

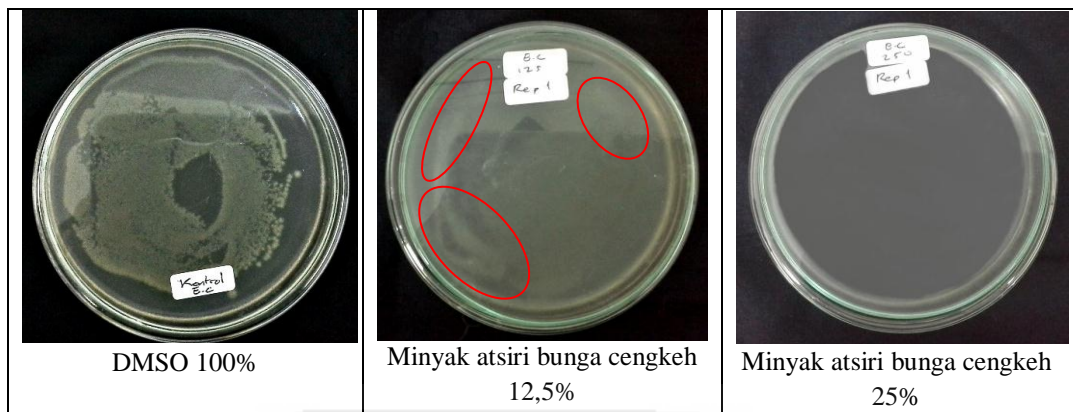
Dari hasil pengamatan menggunakan GC-MS, diketahui bahwa kandungan senyawa yang tertinggi dari minyak cengkeh adalah eugenol, sebesar 87,92%. Dalam persyaratan mutu minyak cengkeh, standar kandungan minimal senyawa eugenol adalah 78%, sehingga minyak cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini sudah memenuhi standar⁽⁴⁶⁾.

4.4. Hasil Uji Efek Antibakteri dengan Metode Gaseous Contact

Minyak atsiri bunga cengkeh dapat larut dalam *dimethylsulphoxide* (DMSO). Pelarut DMSO dipilih karena dapat melarutkan minyak atsiri bunga cengkeh serta tidak memiliki sifat menghambat bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, sehingga tidak mengganggu hasil penelitian. Hal ini dapat terlihat dari permukaan

media yang terlihat keruh setelah dipaparkan dengan DMSO, yang menunjukkan masih terjadinya pertumbuhan koloni bakteri. Minyak atsiri cengkeh dibuat seri kadar dengan menggunakan pelarut DMSO, sehingga didapat konsentrasi 25; 12,5; 6,25; 3,13; dan 1,56%. Pada pembuatan seri kadar, pelarut DMSO digunakan dengan tujuan untuk mempermudah pengambilan minyak atsiri dengan mikropipet dan agar hasil pipetasi lebih akurat karena konsentrasi minyak atsiri yang digunakan sangat kecil. Penentuan MID dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil minyak atsiri yang dapat menekan pertumbuhan bakteri, yang ditandai dengan tidak terlihatnya pertumbuhan koloni bakteri pada permukaan agar. Nilai MID didapat dengan membandingkan jumlah bakteri yang terlihat pada setiap konsentrasi minyak atsiri dan DMSO sebagai kontrol.

Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa konsentrasi terkecil minyak atsiri bunga cengkeh yang telah menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri *E. coli* adalah 25% dan pada bakteri *S. aureus* adalah 12,5%. Hal ini dapat disebabkan karena pada konsentrasi tersebut, uap minyak atsiri bunga cengkeh berdifusi ke dalam sel bakteri dan mulai menghasilkan efek penghambatan pertumbuhan bakteri, sehingga *E. coli* dan *S. aureus* tidak dapat membentuk koloni. Menurut Pelczar (1986), setelah masa inkubasi, bakteri yang telah diinokulasikan ke media akan memperbanyak diri dengan cepat selama 18-24 jam, kemudian terbentuk koloni yang dapat terlihat secara visual⁽⁴⁷⁾. Koloni tersebut ada yang berbentuk lingkaran dan ada pula yang memiliki bentuk tidak teratur. Perbedaannya adalah koloni bakteri *S. aureus* yang terbentuk berwarna agak kuning kecoklatan, sedangkan koloni bakteri *E. coli* berwarna putih atau putih kekuningan. Pada percobaan ini tidak dilakukan penghitungan jumlah koloni, karena aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri sudah dapat terlihat dengan jelas berdasarkan tingkat kekeruhan permukaan media. Semakin keruh media agar, menunjukkan semakin banyaknya koloni bakteri yang terbentuk.



Gambar 4.5. Perbandingan pertumbuhan koloni bakteri *E. coli* pada konsentrasi DMSO 100%, minyak atsiri bunga cengkeh 12,5% dan minyak atsiri bunga cengkeh 25%

Tabel 4.2. Aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga cengkeh dalam bentuk uap pada *E. coli*

Replikasi	MID ($\mu\text{L/L}$ udara)				
	50	25	12,5	6,26	3,12
1	-	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+

Keterangan: (-) tidak ada pertumbuhan; (+) ada pertumbuhan

Pada gambar 4.5, terlihat adanya pertumbuhan bakteri pada media yang diberi uap DMSO 100% (kontrol negatif) dan minyak atsiri bunga cengkeh 12,5%. Masing-masing replikasi pada konsentrasi 15,6%; 31,3%; 62,5%; dan 12,5% masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah pada konsentrasi tersebut, jumlah senyawa aktif dari minyak atsiri bunga cengkeh yang terdispersi ke udara masih terlalu sedikit untuk dapat merusak struktur sel bakteri. Pada media yang diberi uap minyak atsiri bunga cengkeh 25% sudah terlihat jernih. Ketiga replikasi konsentrasi 25% menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *E. coli*. Nilai MID yang diperoleh untuk bakteri *E. coli* pada konsentrasi 25% adalah 50 $\mu\text{L/L}$.

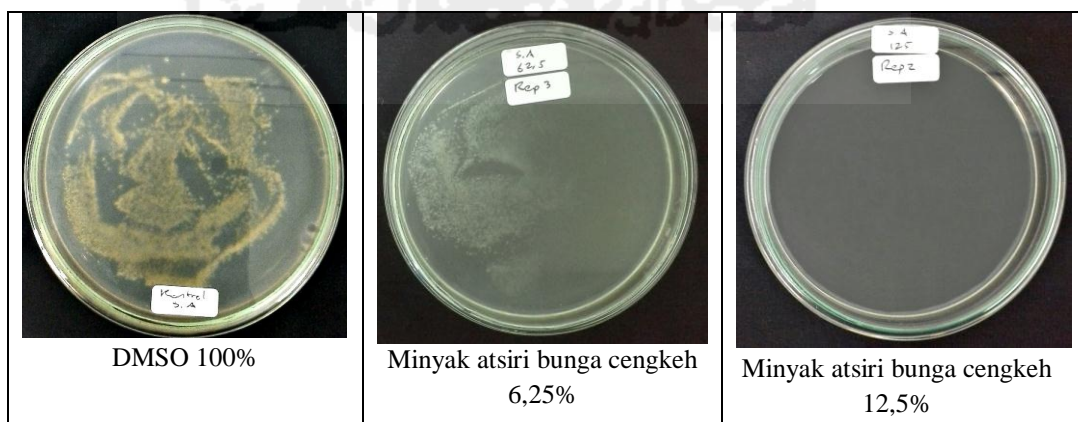
Pada pengujian dengan bakteri *S. aureus*, masing-masing replikasi pada konsentrasi 15,6%; 3,13%, dan 6,25% masih terlihat keruh, yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri mulai terlihat pada konsentrasi 12,5%. Nilai MID yang diperoleh untuk bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 12,5% adalah 25 $\mu\text{L/L}$.

Tabel 4.3. Aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga cengkeh dalam bentuk uap pada *S. aureus*

Replikasi	MID ($\mu\text{L/L}$ udara)				
	50	25	12,5	6,26	3,12
1	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	+

Keterangan: (-) tidak ada pertumbuhan; (+) ada pertumbuhan

Aktivitas penghambatan ini ditandai dengan tidak adanya koloni bakteri yang terbentuk pada replikasi 2 dan 3, tetapi pada replikasi 1 masih ada koloni bakteri yang terbentuk, namun jumlahnya lebih sedikit dibandingkan jumlah koloni yang terbentuk pada konsentrasi 6,25%. Adanya pertumbuhan *S. aureus* pada replikasi 1 ini disebabkan karena pada saat *airtightbox* yang telah diinkubasi dibuka, kertas saring yang telah ditetesi minyak atsiri sudah terlepas dari dinding *airtightbox* sehingga menyentuh sebagian permukaan media. Namun pada bagian media yang bersentuhan dengan kertas saring tersebut tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Sedangkan pada bagian yang tidak bersentuhan dengan kertas saring terdapat pertumbuhan bakteri. Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena minyak atsiri yang menyentuh permukaan media langsung menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan pada bagian yang tidak tersentuh oleh minyak atsiri tidak terjadi penghambatan karena minyak atsiri tertahan pada permukaan media sehingga minyak atsiri yang menguap jumlahnya terlalu sedikit. Pada konsentrasi 25%, ketiga media replikasi terlihat jernih, yang berarti sudah tidak ada koloni bakteri yang terbentuk.



Gambar 4.6. Perbandingan pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus* pada konsentrasi DMSO 100%, minyak atsiri bunga cengkeh 6,25% dan minyak atsiri bunga cengkeh 12,5%

Dari hasil pengamatan tersebut, dapat disimpulkan bahwa semakin besar konsentrasi minyak atsiri, menunjukkan adanya peningkatan penghambatan pertumbuhan bakteri. Hal ini disebabkan karena semakin besar konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh yang terdispersi di udara, maka semakin besar pula jumlah minyak atsiri yang berdifusi ke dalam sel bakteri yang kemudian dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian bakteri. Nilai MID yang didapat adalah 50 $\mu\text{L/L}$ untuk *E. coli* dan 25 $\mu\text{L/L}$ untuk *S. aureus* (Lampiran 5).

Nilai MID yang dibutuhkan minyak atsiri bunga cengkeh untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* lebih kecil daripada *E. coli*. Semakin rendah nilai MID, menunjukkan aktivitas antibakterinya yang semakin kuat, yang berarti minyak atsiri bunga cengkeh memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap bakteri gram positif dibandingkan bakteri gram negatif⁽⁴⁸⁾. Pada sebagian besar literatur disebutkan bahwa bakteri gram negatif lebih resisten terhadap minyak atsiri dibandingkan dengan bakteri gram positif⁽¹⁶⁾⁽⁴⁹⁾. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan struktur bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki struktur dinding selnya lebih kompleks⁽³⁴⁾. Dinding sel bakteri gram negatif terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tipis dan terhubung ke membran sitoplasma dan membran luar⁽¹⁶⁾. Penghubung lapisan peptidoglikan dengan membran luar ini memiliki kanal-kanal hidrofilik yang disebut porin. Porin tersebut dapat menghalangi masuknya senyawa-senyawa hidrofobik seperti minyak atsiri⁽³⁴⁾⁽⁴⁸⁾. Namun penghambatan masih dapat terjadi, karena eugenol memiliki gugus fenolik yang memiliki potensi untuk merusak membran luar⁽³⁴⁾. Sedangkan pada bakteri gram positif, dinding selnya tersusun dari 90-95% lapisan peptidoglikan dan tidak memiliki membran luar⁽³⁴⁾⁽⁵⁰⁾. Menurut Jian-Guo Xu (2016), penghambatan pertumbuhan *S. aureus* oleh minyak atsiri bunga cengkeh tidak hanya sebatas menyebabkan kerusakan fisik seperti merusak bentuk dan struktur sel, namun juga dapat merusak pada tingkat molekuler. Minyak atsiri bunga cengkeh merusak dinding dan membran sel, yang kemudian menyebabkan bakteri kehilangan komponen-komponen intraselular yang berujung pada kematian sel. Di samping itu, minyak atsiri juga berpenetrasi ke dalam sel,

kemudian menghambat sintesis DNA dan protein yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri⁽⁵¹⁾. Julio Cesar (2015), menyebutkan bahwa minyak atsiri dapat menyebabkan keluarnya komponen sel bakteri, termasuk ion K^+ . Pada bakteri *S. aureus* yang dipaparkan dengan senyawa-senyawa fenolik termasuk eugenol, ditemukan banyak ion K^+ di luar sel. Sedangkan pada bakteri *E. coli* yang diberi perlakuan serupa, tidak ditemukan ion K^+ di luar sel. Hal ini disebabkan karena adanya retensi pada lapisan tipis dinding sel *E. coli*⁽³⁴⁾. Dari beberapa penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri bunga cengkeh dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* karena dapat menyebabkan lisis dan menyebabkan kerusakan hingga tingkat molekuler. Sedangkan kerusakan yang terjadi pada bakteri *E. coli* hanya sebatas mengubah struktur dan bentuk membran sel, namun perubahan ini juga sudah dapat menyebabkan kematian sel, karena membran sel berfungsi sebagai *barrier* yang sangat diperlukan untuk berbagai macam aktivitas seluler yang terjadi di dalam sel⁽³⁴⁾⁽⁵⁰⁾.