

# POTENSI CAMPURAN MINYAK ATSIRI RIMPANG TEMULAWAK DAN DAUN CENGKEH SEBAGAI INHIBITOR PLAK GIGI

Dwi Prasasti, Triana Hertiani<sup>\*</sup>

## Abstract

Temulawak rhizome (*Curcuma xanthorrhiza*) and cengkeh leaf (*Syzygium aromaticum*) essential oils have been reported to be potential inhibitors of planktonic growth and biofilm of *S. mutans*. This research aimed to reveal the potency of the essential oils blend and the optimum composition based on its inhibitory effect against planktonic growth and biofilm of *S. mutans* by an in vitro method. Blend composition of temulawak and cengkeh essential oils tested were 1:0; 0.75:0.25; 0.5:0. 1:0; 0.75:0.25; 0.5:0.5; 0.25:0.75 v/v; 0.25:0.75 v/v, respectively, in total concentration of 0.002%. The planktonic growth inhibitory assay was performed against *S. mutans* by micro dilution technique on nutrient broth media. Biofilm formation inhibition and degradation assay was conducted on BHI. Biofilm formation was indirectly assessed by staining with 1% crystal violet. Data was obtained from plate reader in wavelength of 595 nm. The above assays were performed in triplicate. The results were used to determine the SLD formula.

Results showed that the essential oils blend did not significantly influence the planktonic growth inhibition but significantly increase the biofilm formation inhibitory percentage as well as degradation. Optimum composition was determined as temulawak essential oils 55 and cengkeh 45.

**Keywords:** essential oils blend, temulawak rhizome, cengkeh leaf, *S. mutans*

## PENDAHULUAN

Plak gigi merupakan salah satu masalah kesehatan mulut dan gigi yang disebabkan oleh pembentukan biofilm oleh mikroba mulut (Loesche, 1996). Plak berperanan penting dalam perkembangan karies gigi dan penyakit periodontal (Shulman, 1994). Biofilm sendiri merupakan

suatu lapisan yang dibentuk oleh komunitas mikroba sebagai bentuk perlindungan terhadap pengaruh luar termasuk diantaranya antibiotik dan sistem pertahanan tubuh (Donlan, 2001). Pengendalian plak dapat dilakukan dengan pembersihan secara mekanis, serta penggunaan bahan antibakteri terutama untuk menekan *S. mutans* sebagai koloni utamanya (Kolenbrander *et al.*, 2002).

Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, email:  
hadna3ana@yahoo.com

Zat aktif yang selama ini dipergunakan dalam sediaan pasta gigi untuk mengatasi plak antara lain adalah fluor dan cetylpyridinium. Hanya saja fluor memiliki efek samping berupa fluorosis email dan harganya relatif mahal (Hasim, 2003; Pistorius *et al.*, 2003). Sedangkan cetylpyridinium memiliki efek samping antara lain menyebabkan pewarnaan gigi (Ciancio *et al.*, 1978; Lobene dkk., 1979). Oleh karena itu perlu dikembangkan bahan-bahan alternatif yang potensial untuk dikembangkan sebagai anti plak gigi.

Minyak atsiri temulawak dan cengkeh merupakan minyak atsiri yang potensial sebagai inhibitor pertumbuhan planktonik maupun biofilm dari *S. mutans* (Hertiani *et al.*, 2009). Ekstrak etil asetat dari temulawak bahkan telah dipergunakan secara komersial pada sediaan pasta gigi di Korea Selatan dan terbukti memiliki daya antiplak yang efektif. Senyawa aktif yang bertanggungjawab diketahui merupakan xanthorizol (Kim *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2006). Komponen tersebut merupakan komponen yang lazim ditemukan pada minyak atsiri temulawak (Agusta, 2000).

Penggunaan zat antimikroba dalam bentuk kombinasi memiliki keuntungan yaitu melalui efek sinergisme atau adisi, mengurangi kemungkinan terjadinya resistensi selain dapat meningkatkan efektivitas pengobatan, terutama jika keduaanya memiliki mekanisme aksi yang berbeda tetapi saling mendukung (Li & Tang, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Saginur dkk. (2006) menunjukkan bahwa kombinasi antimikroba dapat meningkatkan susceptibilitas mikroba

dalam biofilm. Penggunaan beberapa minyak atsiri dalam campuran dilaporkan mampu meningkatkan efektivitas antimikroba (Pan *et al.*, 2003; Ouhayoun, 2003). Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh kombinasi minyak atsiri temulawak dan daun cengkeh terhadap potensinya sebagai inhibitor plak. Untuk mengetahui komposisi optimum campuran minyak atsiri tersebut digunakan metode *simplex lattice design*. Metode ini merupakan suatu desain untuk melakukan optimasi pada berbagai perbedaan jumlah komposisi bahan yang dinyatakan dalam beberapa bagian dengan jumlah total yang tetap, yaitu satu (Bolton, 1997).

## METODE PENELITIAN

### 1. Penyiapan bahan uji.

Bahan: rimpang segar *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., dan daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) yang dikoleksi di Jogjakarta pada bulan Maret 2009. Bagian tanaman yang akan diuji, diidentifikasi di laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi UGM dengan No. 0185/T.Tb/IV/2010. Sebanyak 5 kg bahan basah diiris tipis dan didestilasi dengan menggunakan alat destilasi air dan uap air selama 6 jam. Minyak atsiri yang diperoleh setelah diukur volumenya untuk menghitung rendemen, diuji indeks biasnya menggunakan Refraktometer Abbe (Atago, Jepang) sesuai Ketaren (1985), kemudian disimpan dalam wadah gelas yang kedap cahaya dan ditutup rapat.

## 2. 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  $\mu\text{l}$  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* ATCC 21752 (PAU Pangan Gizi, UGM) yang digunakan setara standar McFarland II ( $6,0 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ ) yaitu sebanyak 10% v/v dari total suspensi uji. Kontrol positif digunakan produk *mouthwash* dengan kadar 1% v/v dari total suspensi uji. Suspensi uji kemudian diinkubasi pada suhu  $\pm 36,6^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam. Pembacaan *Optical Density (OD)* dilakukan dengan *microplate reader* (Benchmark Biorad, Tokyo, Jepang) pada panjang gelombang 595 nm di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, UGM, replikasi sebanyak tiga kali.

## 3. Uji penghambatan pembentukan biofilm kombinasi minyak atsiri

Pengujian dilakukan sebagaimana diuraikan dalam O'Toole & Kolter (1998) dengan beberapa modifikasi. Media yang digunakan adalah *BHI + sukrosa 2%* pada *microtiterplate flexible U bottom* (Becton Dickinson, USA), dan suspensi bakteri *S. mutans* yang digunakan setara standar McFarland V ( $15,0 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ ) sebanyak 10% v/v dari

total suspensi uji. Kontrol positif digunakan produk *mouthwash* dengan kadar 1% v/v dari total suspensi uji. Suspensi uji selanjutnya diinkubasi pada suhu  $\pm 36,6^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam. Suspensi uji selanjutnya diinkubasi pada suhu  $\pm 36,6^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam. Setelah masa inkubasi, *microplate* dicuci menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali, kemudian ditambahkan 125  $\mu\text{l}$  larutan *CV 1%* ke tiap *well* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. *Microplate* dicuci kembali dengan cara yang sama seperti sebelumnya, yaitu dengan air mengalir sebanyak tiga kali. Larutan etanol 96% sebanyak 200  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam tiap *well* dan dilakukan inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 150  $\mu\text{l}$  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.

## 4. Uji kemampuan degradasi biofilm kombinasi minyak atsiri

Pengujian ini dilakukan sebagaimana penghambatan pertumbuhan biofilm (cara kerja point 3) 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  $\mu\text{l}$  suspensi uji yang terdiri atas minyak atsiri dalam metanol, dan media *BHI + sukrosa 2%*. Setelah masa inkubasi, *microplate* dicuci menggunakan

air mengalir sebanyak tiga kali, dan seterusnya sebagaimana dilakukan pada uji penghambatan pembentukan biofilm.

#### 5. Verifikasi persamaan *SLD* dan penentuan komposisi optimum

Verifikasi dilakukan dengan membandingkan secara statistik data prosen penghambatan yang diperoleh dari pengujian dan yang diperoleh dari hasil perhitungan menggunakan persamaan *SLD*. Rumus yang digunakan untuk memperoleh persamaan *SLD* adalah sebagaimana diuraikan dalam Bolton (1997) sebagai berikut:  $Y = a(A) + b(B) + ab(AB)$ ; 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 ( $A+B = 1$ ).

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

#### 6. Uji KLT-bioautografi (Gibbons & Gray, 1998)

Uji bioautografi dilakukan dengan menotolkan masing-masing  $2\text{ }\mu\text{l}$  1% minyak atsiri dalam toluen pada 3 (tiga) plat silika gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Jerman) dan dielusi menggunakan fase gerak toluen-etil asetat pada perbandingan 93:7 v/v (*pro analyses*, Merck, Darmstad, Jerman) (Wagner & Bladt, 2001). Jarak elusi  $\pm 8\text{ cm}$ . Satu plat digunakan untuk uji antibakteri (bioauto-

grafi), sedangkan plat yang lain digunakan untuk analisis fitokimia (KLT). 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 ( $6,0 \times 10^8\text{ CFU/ml}$ ). Proses penempelan plat pada media padat *NA* ini dilakukan selama 1 jam, dilanjutkan inkubasi pada suhu  $\pm 36,6^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam. Komponen senyawa aktif ditunjukkan zona jernih di sekitar bercak. Pengamatan terhadap dua plat KLT untuk analisis fitokimia dilakukan dengan sinar  $\text{UV}_{254}$ ,  $\text{UV}_{366}$ , dan sinar tampak, sedangkan deteksinya menggunakan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat (dengan pemanasan pada suhu  $\pm 120^\circ\text{C}$  selama 5 menit) dan  $\text{FeCl}_3$  (Wagner & Bladt, 2001).

#### 7. Uji Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa (KG-SM)

Pemeriksaan komponen minyak atsiri 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  $80^\circ\text{C}$ - $270^\circ\text{C}$ , jenis pengionan *EI (Electron Impact)* 70 Ev, gas pembawa helium 16,5 kPa, injeksi dengan cara *split* pada suhu  $290^\circ\text{C}$ .

#### 8. Cara Analisis

Rumus yang digunakan untuk menghitung persen penghambatan adalah sebagaimana dimodifikasi dari Quave *et al.* (2008) sebagai berikut:

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

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 *One-Way ANOVA* dilanjutkan dengan *T-test* (taraf kepercayaan 95%).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen minyak atsiri yang dihasilkan seperti diuraikan pada Tabel 1 menunjukkan adanya sedikit perbedaan dengan data di literatur, yaitu untuk minyak atsiri rimpang temulawak segar adalah sebanyak  $\pm 2\%$  (Agusta, 2000). Ketaren (1985) melaporkan rendemen minyak atsiri daun cengkeh sebesar 2-3%, sedangkan Agusta (2000) melaporkan 2,79%. Indeks bias minyak atsiri rimpang temulawak adalah 1,5024 – 1,5079 sedangkan minyak atsiri daun cengkeh 1,527-1,541 (Ketaren, 1985). Hal tersebut menunjukkan kesesuaian data dengan hasil percobaan.

Hasil optimasi komposisi campuran minyak

atsiri temulawak dan cengkeh dengan metode *Simplex lattice design* seperti ditunjukkan pada Tabel 2. Hasil analisis statistik seperti ditunjukkan pada Tabel 3 dan Tabel 4. Hasil analisis statistik daya penghambatan pertumbuhan planktonik campuran minyak atsiri menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna diantara semua komposisi yang menunjukkan bahwa campuran minyak atsiri tersebut tidak berpengaruh terhadap kemampuan penghambatan pertumbuhan planktonik *S. mutans*. Hal tersebut didukung oleh bentuk kurva hasil perhitungan dengan persamaan *SLD* yang mendekati garis lurus.

Tabel I. Parameter fisik minyak atsiri hasil percobaan

Parameter	Minyak atsiri temulawak	Minyak atsiri cengkeh
Rendemen	0,18% v/b	3,2% v/b
Indeks bias	1,503	1,531
Warna	Kuning jingga	Kuning pucat
Rasa	Pahit	Tajam dan pedas getir
Bau	Aromatik khas temulawak	Aromatik khas cengkeh

Tabel 2. Optimasi kombinasi minyak atsiri temulawak dan cengkeh menggunakan metode *SLD*

Sampel	Penghambatan Planktonik (%)	Penghambatan Biofilm (%)	Daya Degradasi (%)
Temulawak	14,19 $\pm$ 2,49	23,30 $\pm$ 1,47	48,67 $\pm$ 23,25
T75:C25	19,95 $\pm$ 12,63	35,96 $\pm$ 14,44	97,74 $\pm$ 4,57
T50:C50	16,38 $\pm$ 9,67	56,16 $\pm$ 2,35	74,44 $\pm$ 23,45
T25:C25	13,09 $\pm$ 3,97	26,50 $\pm$ 7,02	74,61 $\pm$ 5,13
Cengkeh	11,36 $\pm$ 4,18	9,01 $\pm$ 2,52	27,98 $\pm$ 15,86
Persamaan SLD	Y = 14,19A+11,36B+17,73AB	Y = 23,30A+9,01B+112,26AB	Y = 48,67A+27,98B+210,90AB

Tabel 3. Hasil Analisis Statistik Daya Penghambatan Pembentukan Biofilm Campuran Minyak Atsiri Temulawak dan Cengkeh pada Taraf Kepercayaan 95% (n = 3)

Planktonik	Temulawak 100%	T75:C25	T50:C50	T25:C75	Cengkeh 100%
Temulawak 100%	[checkered]		*		
T75:C25		[checkered]	*		*
T50:C50	*	*	[checkered]	*	*
T25:C75			*	[checkered]	
Cengkeh 100%		*	*		[checkered]

\* = berbeda signifikan

Tabel 4. Hasil Analisis Statistik Daya Degradasi Biofilm Campuran Minyak Atsiri Temulawak dan Cengkeh pada Taraf Kepercayaan 95% (n=3)

Planktonik	Temulawak 100%	T75:C25	T50:C50	T25:C75	Cengkeh 100%
Temulawak 100%	[checkered]	*			
T75:C25	*	[checkered]	*		*
T50:C50		*	[checkered]		
T25:C75				[checkered]	*
Cengkeh 100%		*		*	[checkered]

Keterangan: \* = berbeda signifikan

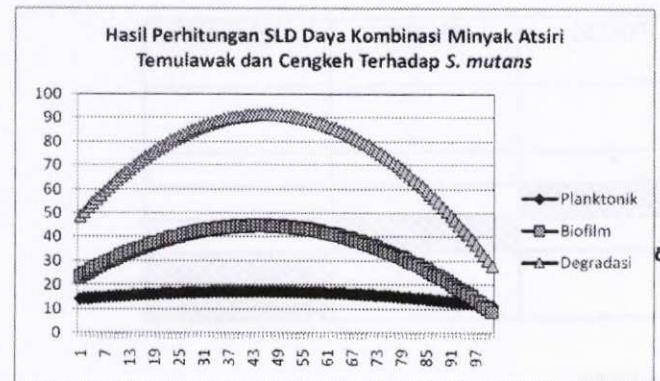
Pengamatan pada kurva hasil perhitungan persen penghambatan dengan persamaan *SLD* (Gb.1) menunjukkan kurva berbentuk melengkung ke bawah yang menunjukkan bahwa pencampuran kedua minyak atsiri meningkatkan aktivitas penghambatan pembentukan biofilm. Hal ini didukung oleh hasil analisis statistik yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada beberapa komposisi campuran. Besarnya harga standar deviasi menyebabkan perbedaan signifikan tidak ditemui pada semua pasangan komposisi yang diuji. Fenomena yang sama dapat ditemui pada kurva hasil perhitungan persen kemampuan degradasi biofilm campuran minyak

atsiri yang diperoleh dari persamaan *SLD* serta analisis statistiknya (Gb.1 dan tabel IV).

Verifikasi terhadap persamaan *SLD* yang diperoleh dilakukan dengan menguji campuran minyak atsiri pada komposisi temulawak dan cengkeh 60:40 v/v. Hasil yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode T-test seperti tercantum pada tabel V. Hasil verifikasi menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil pengujian dengan hasil perhitungan menggunakan persamaan *SLD* yang diperoleh. Hal tersebut menunjukkan bahwa persamaan tersebut dapat dipergunakan untuk menghitung komposisi campuran minyak atsiri optimum.

Tabel 5. Analisis Statistik Hasil Verifikasi Persamaan SLD Campuran Minyak Atsiri Temulawak dan Cengkeh pada Taraf Kepercayaan 95% ( $n=3$ ) Temulawak 100% T:C=1:1 Cengkeh 100%

Jenis Pengujian	Hasil Perhitungan	Hasil Pengujian	Analisis Statistik
Penghambatan pertumbuhan planktonik	17,3132	$15,51 \pm 11,30$	Tidak berbeda bermakna
Penghambatan pembentukan biofilm	44,5264	$46,34 \pm 18,00$	Tidak berbeda bermakna
Kemampuan degradasi biofilm	91,01	$84,19 \pm 15,67$	Tidak berbeda bermakna



Gambar.1 Diagram hasil perhitungan SLD daya kombinasi minyak atsiri campuran minyak atsiri temulawak dan cengkeh terhadap *S. mutans* Keterangan: T: temulawak, C: cengkeh

Penentuan komposisi optimum dilakukan dengan cara menghitung harga  $R_{total}$  dengan persamaan sebagai berikut:  $R_1 = N_1 \times 0,1$ ;  $R_2 = N_2 \times 0,4$ ;  $R_3 = N_3 \times 0,5$ .  $N = (X - X_{min}) / (X_{max} - X_{min})$ , dimana  $R_1$  = persen penghambatan pertumbuhan planktonik;  $R_2$  = persen penghambatan pembentukan biofilm dan  $R_3$  = menunjukkan persen degradasi.  $X_{min}$  untuk  $R_1$  adalah: 11,36 sedangkan  $X_{max} = 100$ ;  $X_{min}$  untuk  $R_2$  adalah 9,01, dan  $X_{max} = 100$ ;  $X_{min}$  untuk  $R_3$  adalah 27,98,  $X_{max} = 100$ . Hasil perhitungan menunjukkan bahwa campuran minyak atsiri dengan komposisi

temulawak 55 dan cengkeh 45 memiliki harga  $R_{total}$  paling besar yaitu: 0,604786.

Hasil bioautografi menunjukkan bahwa kandungan aktif minyak atsiri daun cengkeh merupakan senyawa fenolik. Hal tersebut ditunjukkan dengan perubahan warna bercak aktif (hRf 50) menjadi biru ungu setelah disemprot dengan  $FeCl_3$ , dan warna coklat setelah disemprot dengan anisaldehid asam sulfat. Hal tersebut sesuai data eugenol yang dikemukakan oleh Wagner & Bladt (2001) yaitu perubahan warna bercak menjadi oranye-coklat dengan hRf ~ 50 setelah disemprot vanilin asam sulfat. Bercak tersebut merupakan bercak yang dominan dalam minyak atsiri. Hasil pengujian didukung oleh hasil KG-SM yang menunjukkan keberadaan eugenol sebagai senyawa mayor (77,85%) (Ardani *et al.*, 2010). Demikian pula halnya bercak aktif pada minyak atsiri temulawak aktif (hRf 62) merupakan senyawa fenolik.

Komponen utama minyak atsiri temulawak menurut Agusta (2000) adalah DL-kamfor (11,29%), a-kurkumina (17,68%), S-(R,S)-5-(1,5-dimetil-4-heksenil)-2-metil-1,3-sikloheksadiena (20,88%), germakren (5,98%), (E,E)10-(1-metiletenil)3,7-sikloheksadien-1-on (8,68%) dan xanthorizol (7,47%). Hasil penelitian menunjukkan 36 puncak dengan 6 (enam) senyawa utama sebagai berikut: kamfor (12,207 menit, 11,04%); alfa-kurkumen (22,232 menit, 10,33); 1H-3a,7-methanoazulene,2,3,4,7,8a-heksahidro-3,6,8,8-tetrametil-[3R-(3.alfa.,3a.be-ta.,7.beta.,8a.alfa.)] (22,983 menit, 8,95%); senyawa tidak diketahui yang menunjukkan *base peak*

122,05, waktu retensi 25,499 menit, 16,16%; germakron (27,807 menit, 9,87%) dan senyawa tidak diketahui yang menunjukkan *base peak* 136,10 (28,908 menit, 25,07%). Data library dari KG-SM (Wiley7.LIB) minyak temulawak tidak menunjukkan keberadaan xanthorrhizol dalam minyak atsiri, kemungkinan karena kadarnya yang relatif rendah dibandingkan komponen lain atau dikarenakan ketidaksediaan data di Library yang digunakan. Lee dkk (2008) menyatakan BM xanthorrhizol adalah 218 yang kemungkinan ditunjukkan oleh puncak dengan waktu retensi 28,908 (25,07%). Wagner & Bladt (2001) melaporkan bahwa xanthorrhizol memberikan warna bercak biru violet pada  $bRf \sim 55$  atau tepat di atas bercak timol standar, sedangkan bercak aktif antibakteri menunjukkan warna bercak dengan  $bRf$  sebesar 62, yang memberikan warna merah violet setelah disemprot anisaldehid asam sulfat, di atas standar timol yang meunjukkan  $bRf \sim 57$ . Sehingga masih belum bisa dipastikan apakah bercak senyawa aktif antibakteri yang terdapat pada minyak temulawak merupakan xanthorrhizol.

Komponen minyak atsiri yang berupa senyawa fenolik merupakan golongan senyawa yang paling efektif sebagai agen antimikroba (Celikel & Kavas, 2008). Aktivitas senyawa fenolik sebagai antibakteri antara lain melalui ikatan fenol dengan membran sel yang mengakibatkan perubahan permeabilitas sel, diikuti kebocoran konstituen sel yang esensial dan berujung pada kematian bakteri (Siswandono & Soekarjo, 1995).

Interaksi antara senyawa fenolik dengan

protein bakteri dijelaskan lebih lanjut dalam Siswandono dan Soekarjo (1995) adalah melalui proses adsorbsi yang melibatkan ikatan hidrogen yang dapat menyebabkan koagulasi protein. Reaksi tersebut tidak hanya menjelaskan aktivitas antibakteri senyawa fenolik, tetapi dapat menjelaskan pula mekanisme aksi penghambatan pembentukan biofilm. Sebagaimana diketahui bahwa mekanisme pembentukan biofilm pada *S. mutans* antara lain melibatkan enzim glucosiltransferase yang bekerja mensintesis sukrosa dalam media menjadi glukan yang merupakan komponen penyusun biofilm (Devulapalle & Mooser, 2001). Inaktivasi enzim tersebut oleh senyawa fenolik dapat menyebabkan dihambatnya pembentukan biofilm oleh bakteri.

Hasil uji bioautografi untuk campuran kedua minyak atsiri dengan perbandingan 1:1 menunjukkan bahwa bercak yang positif antibakteri memiliki  $bRf$  dan perubahan warna yang sama pada reaksi identifikasi untuk minyak atsiri temulawak, sedangkan aktivitas eugenol tidak terdeteksi. Hal tersebut kemungkinan disebabkan kadar yang terlalu kecil atau transfer senyawa yang kurang baik dari plat silika ke media. Faktor yang dapat mempengaruhi hasil bioautografi antara lain adalah kapasitas difusi komponen minyak atsiri melalui media (Ramírez-Mares *et al.*, 2010). Hal tersebut mendukung hasil optimasi komposisi campuran minyak atsiri untuk uji penghambatan pertumbuhan planktonik yang menunjukkan bahwa campuran minyak atsiri tidak mempengaruhi aktivitasnya secara signifikan.

## KESIMPULAN

Kombinasi minyak atsiri rimpang temulawak dan daun cengkeh tidak berpengaruh pada persen penghambatan pertumbuhan planktonik *S. mutans*, tetapi meningkatkan persen penghambatan pembentukan biofilm dan kemampuan degradasi biofilm. Komposisi kombinasi minyak atsiri optimum yang diperoleh adalah temulawak 55: cengkeh 45.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari skripsi Dwi Prasasti (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

- Agusta, A., 2000. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. Penerbit ITB, Bandung,
- Ardani, M., Pratiwi, S.U.T., Hertiani, T., 2010. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. *Majalah Farmasi Indonesia*. In press.
- Bolton, S., 1997. *Optimization Techniques*. In: *Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications*. 3<sup>rd</sup> ed. Marcel Dekker Inc. New York.
- Celikel, N., Kavas, G., 2008, Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic, *Czech J. Food Sci.*, 26(3): 174-181
- Ciancio, S.G., Mather, B.S., Burnell, H.L., 1978. The Effect of a Quaternary Ammonium Containing Mouthwash on Formed Plaque. *Pharmacol Ther Dent.*, 3: 1-6.
- Devulapalle, K.S., Mooser, G., 2001. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J.Dent. Res.*, 80(2): 466-469.
- Donlan, R.M., 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, *Clinical Infectious Disease*, 33: 1387-1392.
- Gibbons, S., Gray, A.I., 1998. Isolation by Planar Chromatography. In: *Cannell, R.J.P. (Ed.)*, *Natural Product Isolation*, Totowa, Humana Press, New Jersey.
- Hasim, 2003. Daun sirih sebagai antibakteri pasta gigi, *Kompas 24 September 2003*.
- Hertiani, T., Pratiwi, S.U.T., Kuswahuning, R., Adityaningrum, S., Pranoto, B., Irianto, I.D.K., Prasasti, D., Ardani, M., 2009. Eksplorasi Minyak Atsiri Sebagai Alternatif Bahan Aktif Pasta Gigi Anti Plak Berdasarkan Aktivitas Anti Bakteri Dan Inhibitor Biofilm Pada *Streptococcus Mutans* Secara *In Vitro*, *Laporan Penelitian*, Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Hwang, J.-K., 2006. Challenges and opportunities in applying Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) for industrial oral care product. *Prosiding Seminar Nasional HKI*, 25-32.
- Ketaren, E., 1985. *Teknologi Minyak Atsiri*. Balai Pustaka. Jakarta.
- Kim, J.-E., Kim, H.-E., Hwang, J.-K., Lee, H.-J., Kwon, H.-K., and Kim, B.-I., 2008. Antibacterial characteristics of *Curcuma xanthorrhiza* extract on *Streptococcus mutans* biofilm. *The Journal of Microbiology*, 46(2): 228-232.
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Egland, P.G., Foster, J.S., Palmer, R.J., 2002.

- Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:486-505.
- Lee, L.Y., Shim, J.S., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., 2008. Antibacterial activity of xanthorrhizol isolated from Curcuma xanthorrhiza Roxb. Against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 71(9):1926-1930.
- Li, R.C., Tang, M.C., 2004. Post-antibiotic effect induced by an antibiotic combination: influence of mode, sequence and interval exposure, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 904-908.
- Lobene, R.R., Kashket, S., Soparker, P.M., Schloss, J., Sabine, Z.M., 1979. The Effect of CPC on human plaque bacteria and gingivitis. *Pharmacol Ther Dent*, 4: 33-47
- Loesche, W.J., 1996. Microbiology of dental decay and periodontal disease, In: Baron, S., Peake, R.C.; James, D.A., Susman, M., Kennedy, C.A., Singleton, M.J.D., Schuenke, S. (Eds.). 4<sup>th</sup> Ed., *Medical Microbiology*, The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- O'Toole, G., 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. Clin Periodontol*, 30 Suppl. 5:10-2.
- Pan, P.H., Finnegan, M.B., Sturdivant, L., Barnett, M.L., 2003. Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J. Clin. Periodontol*, 26(7): 474-476.
- Pistorius, A., Willershausen, B., Steinmeir, E.M., Kreisler, M., 2003. Efficacy of subgingival irrigation using herbal extract on gingival inflammation. *Journal of Periodontal*, 74:616-622.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T., Bennett, B.C., 2008. Effects of Extracts from Italian Medicinal Plants on Planktonic Growth, Biofilm Formation and Adherence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Ethnopharmacology*, 118 (3): 418-428.
- Ramírez-Mares, M.V., Sánchez-Burgos, J.A., Hernández-Carlos, B., 2010. Antioxidant, Antimicrobial and Antitopoisomerase Screening of the Stem bark Extracts of Ardisia compressa. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(4): 307-313
- Saginur, R., St. Denis, M., Ferris, W., Aaron, S.D., Chan, F., Lee, C., Ramotar, K., 2006. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilm from implant-associated infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1):55-61
- Shulman, 1994. *Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi*. Ed. 4. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Siswandono, Soekardjo, B., 1995. *Kimia Medisinal*. Airlangga Press, Surabaya.
- Wagner, H., Bladt, S., 2001. *Plant Drug Analyses: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag, Berlin.