



Seminar Biologi Kebangsaan 2025

<https://semarakilmu.my/index.php/spnes/index>
ISSN: 3083 - 8193



Penggunaan Cengkih (*Syzygium aromaticum*) Dalam Menurunkan Bilangan Bakteria Serta Cadangan Aktiviti Secara In Siliko

*The Use of Clove (*Syzygium aromaticum*) in Reducing Bacterial Counts and Suggested In Silico Activity*

Nazlina Ibrahim[✉], Azra Insyirah Suhaimi, Nurulhuda 'Adibah Roslin

¹ Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

ABSTRACT

Cengkih (*Syzygium aromaticum*) merupakan rempah yang sering digunakan dalam masakan namun mempunyai kandungan fitokimia yang berperanan menghalang pertumbuhan bakteria. Kajian ini dilakukan bagi membuktikan kebolehan cengkih dalam mengurangkan bilangan bakteria daripada sampel air liur berbanding bahan kumur komersial. Selain itu, cadangan aktiviti pengurangan bilangan bakteria dikenalpasti menggunakan pendekatan secara in siliko. Bilangan bakteria dibandingkan berdasarkan unit pembentukan koloni dalam air liur sebelum dan selepas 30 minit kunyahan dengan cengkih atau bahan kumur komersial sebagai kawalan. Hasil menunjukkan purata unit pembentukan koloni (upk) sebelum kunyahan cengkih adalah sebanyak 2.86×10^6 upk/mL dan menurun kepada 2.16×10^6 upk/mL selepas kunyahan dengan cengkih. Penurunan bilangan koloni bakteria sebelum dan selepas kunyahan cengkih adalah signifikan ($p < 0.05$) dengan nilai $p = 0.030$. Bilangan purata koloni sebelum menggunakan ubat kumur pula adalah 2.13×10^6 upk/mL dan selepas menggunakan ubat kumur adalah 1.22×10^6 upk/mL dengan nilai $p = 0.001$ ($p < 0.05$). Penurunan bilangan koloni bakteria adalah juga signifikan selepas penggunaan ubat kumur. Bakteria yang berjaya dipencilkan terdiri kebanyakannya daripada *Streptococcus* sp. dan *Staphylococcus* sp., yang sering ditemui dalam mulut manusia. Interaksi fitokimia terhadap enzim lisozim serta protein bakteria serta kesan juga dilaksanakan. Sebatian fitokimia utama cengkih iaitu eugenol dilakukan pendokan dengan lisozim menunjukkan terdapat interaksi dengan skor afiniti sebanyak -5.4 kCal/mol yang mencadangkan kemampuannya meningkatkan aktiviti enzim lisozim yang membantu membunuh bakteria mulut. Selain itu terdapat dua tapak pelekatan yang berbeza antara protein adhesin P1 *Streptococcus mutans* dengan eugenol dengan afiniti pelekatan -5.1 kCal/mol dan -3.89 kCal/mol. Kesan pengikatan ini boleh mengganggu kestabilan protein-ligan yang terbentuk yang boleh menjejaskan fungsi pelekatan bakteria.

*Clove (*Syzygium aromaticum*) is a spice that is often used in cooking but has phytochemicals that inhibit bacterial growth. This study was conducted to prove the ability of cloves to reduce the number of bacteria in saliva samples compared to commercial mouthwashes. In addition, the proposed activity of reducing the number of bacteria was identified using an in silico approach. The number of bacteria was compared based on colony forming units in saliva before and after 30 minutes of chewing with cloves or commercial mouthwash as a control. The results showed that the average colony forming units (CFU) before chewing cloves was 2.86×10^6 CFU/mL and decreased to 2.16×10^6 CFU/mL after chewing cloves. The decrease in the number of bacterial colonies before and after chewing cloves was significant ($p < 0.05$) with a p value of 0.030. The average number of colonies before using the mouthwash was 2.13×10^6 cfu/mL and after using the mouthwash was 1.22×10^6 cfu/mL with a p value of 0.001 ($p < 0.05$). The decrease in the number of bacterial colonies was also significant after using the mouthwash. The bacteria that were successfully isolated consisted mostly of *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp., which are often found in the human mouth. Phytochemical interactions with lysozyme enzymes and bacterial proteins and effects were also carried out. The main phytochemical compound of cloves, eugenol, was docked with lysozyme showing an interaction with an affinity score of -5.4 kCal/mol which suggests its ability to increase the activity of the lysozyme enzyme which helps kill oral bacteria. In addition, there are two different adhesion sites between the adhesin protein P1 of *Streptococcus mutans* with eugenol with an adhesion affinity of -5.1 kCal/mol and -3.89 kCal/mol. This binding effect can disrupt the stability of the formed protein-ligands which can affect the adhesion function of bacteria.*

[✉] Corresponding author.

E-mail address: nazlina@ukm.edu.my

Keywords: bakteria mulut; cengkih; eugenol; in siliko; lisozim; adhesin P1

1. Introduction

Cengkih atau *Syzygium aromaticum* telah digunakan di dalam perubatan tradisional disebabkan oleh sifat antibakteria dan anti-keradangan yang dimilikinya [1](Pandey dan Singh, 2011). Zaman Dinasti Han yang pertama merekodkan penggunaan cengkih sebagai pewangi mulut bilamana pengunjung istana mestilah mengunyah cengkih terlebih dahulu sebelum bertemu Maharaja supaya dapat mengurangkan bau mulut [2](Parle dan Deepa, 2016). Di Malaysia, terdapat petua yang mengatakan bahawa kunyahan cengkih mampu untuk menyegarkan mulut. Hal ini disebabkan oleh kehadiran bahan antimikrob seperti eugenol di dalam cengkih yang mampu merawat bakteria yang hadir di dalam mulut manusia sekaligus mengurangkan risiko nafas berbau [3](Hosseini et al., 2011). Walaupun telah banyak laporan berkaitan aktiviti antibakteria ekstrak cengkih, sehingga kini laporan saintifik mengenai cengkih yang menunjukkan berlakunya pengurangan mikrob hasil aktiviti kunyahan cengkih masih kurang. Selain itu, perubatan konvensional seperti ubat kumur yang mengandungi alkohol mendatangkan banyak kesan negatif kepada pengguna. Maka, kajian ini dilaksanakan bagi mengkaji kebolehan dan keberkesanan cengkih dalam kunyahan sebagai antimikrob dan kaitannya sebagai penyegar mulut dan bagi lebih memahami mekanisme tindakan cengkih menggunakan pendekatan in siliko terhadap protein bakteria dan enzim lisozim.

2. Methodology

2.1 Bahan

Bunga cengkih yang dibeli di pasar mini dibasuh dengan air suling dan sedia untuk digunakan. Ubat kumur komersil (Colgate®) digunakan dalam kajian ini sebagai kawalan positif cengkih dalam membasmi kuman di dalam mulut. Medium pengkulturan mikroorganisma yang telah digunakan bagi kajian ini adalah agar nutrien (NA) yang sesuai untuk pengkulturan bakteria aerobik dan anaerobik. Bahan yang digunakan untuk pewarnaan Gram adalah kristal violet, iodine Gram, etanol, safranin, minyak rendaman kanta, kertas pengelap kanta dan kertas penyerap. Bahan yang telah digunakan bagi ujian biokimia pula ialah 3% hidrogen peroksida (H₂O₂) bagi ujian katalase dan kit reagen (Staphytest Plus) untuk ujian koagulase.

2.2 Data Set Protein bagi Pendokan Molekul

Struktur protein yang telah digunakan untuk kajian ini diperolehi daripada laman sawang Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) dalam format pdb. Protein pertama yang dipilih adalah lisozim yang bertindak sebagai penerima dan mempunyai reseptor atau tapak aktif protein yang dijangka mempunyai kesan tindak balas yang positif dengan ligan fitokimia yang dipilih iaitu eugenol. Struktur protein yang dipilih juga adalah bebas daripada mutasi atau sebarang modifikasi untuk memastikan tiada kesan yang berlaku terhadap konformasi akhir protein. Protein yang dipilih seterusnya telah dilakukan penulenan di mana sebarang rantai sisi, ligan dan molekul yang tidak berkaitan akan dikeluarkan daripada struktur protein menggunakan perisian Chimera.

Protein kedua adalah adhesin P1 daripada *Streptococcus mutans* yang digunakan untuk pendokan bersama ligan iaitu eugenol (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3314>) daripada cengkih. Fail protein yang digunakan diperolehi daripada perisian RCSB Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org/>. Kemudian ligan yang dikehendaki pula diperolehi daripada perisian

Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pendokan antara protein bakteria dengan ligan yang dipilih dijalankan menggunakan perisian *Autodock 4.2* di mana protein sebelum itu juga disediakan menggunakan perisian yang sama.

2.3 Persampelan air liur

Kajian ini terhad kepada satu subjek sahaja oleh kerana pada masa kajian ini dilakukan terdapat kekangan peraturan semasa wabak COVID-19. Sampel air liur diambil daripada salah seorang penulis sendiri sebelum dan selepas kunyahan cengkih. Kriteria subjek adalah pertama tidak mengambil sebarang antibiotik sepanjang 3 bulan sebelum persampelan bagi memastikan hasil yang didapati adalah tepat [4]. Subjek tidak mengambil makanan 12 jam sebelum pengambilan sampel bagi mengelak makanan atau minuman tumbuh di dalam mulut dan di celah gigi [5]. Subjek perlu memberus gigi dilakukan pada jam 8.00 bagi mengelak pertumbuhan beban bakteria yang terlalu banyak. Persampelan sebelum kunyahan dilakukan pada masa yang sama bagi mendapatkan hasil yang konsisten iaitu pada pukul 10.30 pagi. Sampel air liur telah diambil dan dikumpulkan daripada kaviti mulut subjek sebanyak kira-kira 0.5 ml ke 1 ml [5] dan dimasukkan ke dalam mikrotiub 1.5 mL. Kunyahan sebiju cengkih kering dilakukan sehingga sedikit hancur dan lembut selama 5 minit sebelum cengkih tersebut dibuang. Sampel air liur subjek diambil setelah 1 minit cengkih dibuang. Bagi kawalan positif pula, langkah yang sama diulang, kecuali subjek telah berkumur menggunakan ubat kumur selama 5 minit, sebelum meludahkan ubat kumur tersebut. Sampel air liur diambil selepas 1 minit ubat kumur dibuang. Persampelan dilakukan sebanyak dua kali.

2.4 Pencairan Sampel Air Liur dan Penentuan Bilangan Koloni

Semua sampel air liur dicairkan secara bersiri menggunakan penimbal garam fosfat (PBS) bermula daripada pencairan 10^{-1} sehingga 10^{-5} . Hanya 100 μ l daripada pencairan disebarkan secara aseptik pada permukaan agar piring NA dengan dua replikat dan dieram secara aerobik pada suhu 37°C selama 24 jam. Hanya bilangan koloni bakteria di dalam anggaran 30 ke 300 koloni pada pencairan sesuai sahaja digunakan dalam pengiraan bilangan koloni. Bilangan koloni ditentukan menggunakan formula berikut: $N=n/(d \times v)$ dengan N =Jumlah bilangan koloni (upk/mL), n = bilangan koloni bakteria atas piring agar, d = pencairan dan v = isipadu sampel yang ditambah atas setiap piring agar (mL). Jumlah bilangan koloni bakteria daripada sampel sebelum dan selepas kunyahan cengkih dianalisis secara statistik melalui ujian t-berpasangan dengan menggunakan Minitab.

2.5 Pengenalpastian Bakteria daripada Sampel Air Liur

Bakteria yang telah dipencilkan daripada pengkulturan sampel air liur dikenalpasti melalui pencerapan ciri-ciri morfologi, pewarnaan Gram dan ujian-ujian biokimia. Morfologi koloni bakteria ditentukan dari segi saiz, warna, bentuk dan pertumbuhannya di atas piring agar.

2.6 Pendokkan Molekul

Eugenol dipilih sebagai ligan berdasarkan saringan awal sebatian-sebatian yang hadir dalam cengkih. Dua protein yang terpilih pula adalah lisozim yang terdapat dalam air liur dan protein adhesin P1 daripada *Streptococcus mutans*. Sebelum pendokan dijalankan, tapak pengikatan protein lisozim dan adhesin P1 terlebih dahulu dikenalpasti untuk mengetahui secara tepat tempat perlekatan yang paling berkesan terhadap eugenol. Laman web PrankWeb: Ligand Binding

SitePrediction (prankweb.cz) telah digunakan untuk meramalkan tapak aktif protein lisozim dan adhesin P1 ini.

Pendokan molekul dilakukan kepada struktur molekul protein kepada struktur ligan. Perisian Autodock Vina (<https://vina.scripps.edu/>) telah digunakan untuk melakukan pendokan lisozim dan adhesin P1 dengan eugenol. Keputusan yang diperoleh telah dianalisis berdasarkan nilai keafinan pengikatan (kcal/mol) eugenol terhadap protein lisozim. Nilai keafinan pengikatan adalah tahap kekuatan ligan mengikat kepada protein sasaran. Dengan ini, interaksi dan tahan pengikatan antara protein lisozim dan eugenol dapat dikaji.

3. Results & discussion

3.1 Perbandingan Bilangan Koloni Sebelum dan Selepas Rawatan

Penurunan bakteria selepas kunyahan cengkih adalah signifikan, walaupun kurang berbanding ubat kumur komersial (Jadual 1). Analisis statistik menggunakan ujian t-berpasangan menunjukkan bilangan koloni bakteria bagi sebelum dan selepas kunyahan cengkih adalah signifikan kerana nilai p yang bersamaan dengan 0.030. Kesimpulannya, terdapat perbezaan signifikan antara bilangan pertumbuhan koloni bakteria bagi sebelum dan selepas kunyahan cengkih.

Analisis statistik melalui ujian t-berpasangan menunjukkan bilangan koloni bakteria bagi sebelum dan selepas penggunaan ubat kumur adalah signifikan kerana nilai p yang bersamaan dengan 0.001. Oleh itu, hipotesis nol ditolak dan hipotesis alternatif diterima. Kesimpulannya, terdapat perbezaan signifikan antara bilangan pertumbuhan koloni bakteria bagi sebelum dan selepas penggunaan ubat kumur.

Berdasarkan data dan analisis yang diperoleh, boleh disimpulkan bahawa, kesan antimikrob daripada kunyahan cengkih memberi kesan yang lebih kurang sama dengan kesan antimikrob daripada penggunaan ubat kumur dengan pertumbuhan bakteria di dalam mulut berjaya dikurangkan. Dengan ini, cengkih mempunyai potensi yang besar dalam menurunkan populasi bakteria alternatif semula jadi yang bebas daripada kesan sampingan malah selamat juga untuk dimakan.

Jadual 1

Bilangan koloni bakteria (upk/mL) dan purata dalam sampel sebelum dan selepas kunyahan cengkih serta ubat kumur komersial. Ujian t berpasangan digunakan dalam analisis dengan nilai $p < 0.05$ adalah signifikan

Rawatan	Sebelum ($\times 10^6$ upk/mL)	Selepas ($\times 10^6$ upk/mL)	Nilai t	Nilai p	Keputusan
Cengkih	2.863 \pm 0.039	2.16 \pm 0.38	3.88	0.030	Signifikan
Ubat kumur komersial	2.13 \pm 0.062	1.22 \pm 0.074	15.95	0.001	Signifikan

3.2 Bakteria Pencilan Air Liur

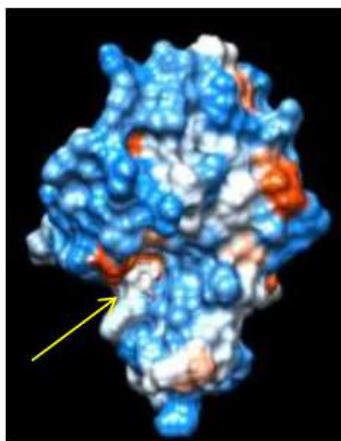
Bakteria utama yang dikesan: *Streptococcus* sp. dan *Staphylococcus* sp. *Streptococcus* sp. di dalam mulut manusia adalah bersifat komensal dan tidak periodontopatogenik dan sesetengah diketahui menyebabkan endokaritis tidak berjangkit apabila disebarkan melalui aliran darah [6]. Smith *et al.*, [7] menunjukkan bahawa pelbagai spesies *Staphylococcus* sp. boleh diasingkan dari rongga mulut.

Spesies paling kerap dilaporkan di ditemui daripada sampel di mulut ialah *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* dan *S. simulans*.

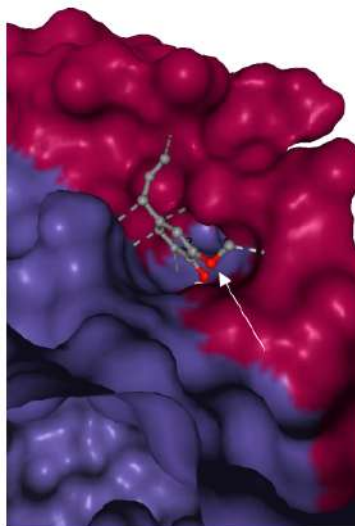
3.3 Cadangan Mekanisme Tindakan Melalui Analisis In Siliko

Tenaga pelekatan adalah tenaga yang dibebaskan semasa proses pelekatan antara protein dengan ligan. Manakala afiniti pelekatan pula merupakan nilai penarikan protein dengan ligan. Afiniti antara eugenol–lisozim adalah -5.4 kCal/mol dengan tapak pengikatan ditunjukkan dalam Rajah 1. Berdasarkan nilai afiniti dan perlekatan tersebut, adalah dicadangkan berlaku peningkatan aktiviti antibakteria semula jadi lisozim. Kesan antibakteria cengkkih berpunca daripada interaksi molekul eugenol yang meningkatkan aktiviti enzim lisozim pernah dinyatakan oleh [8]. Manakala, Ulanowska dan Olan [9] mengatakan bahawa eugenol dapat menguatkan tindakan lisozim dalam merosakkan membran sel bakteria. Maka dicadangkan berdasarkan hasil yang diperolehi daripada kajian ini bahawa interaksi antara lisozim dan eugenol mampu meningkatkan aktiviti lisozim dalam membasmi bakteria di dalam mulut. Perkara ini berjaya selari dengan dapatan berlaku pengurangan dalam bilangan koloni bakteria daripada sampel air liur sebelum dan selepas kunyahan cengkkih (Jadual 1).

Terdapat dua tapak pengikatan Eugenol–Adhesin P1 dengan afiniti -5.1 dan -3.89 kCal/mol (Rajah 2). Kesan pengikatan ini boleh mengganggu fungsi pelekatan bakteria, sekali gus mengurangkan kebolehan membentu biofilm seterusnya menghalang pelekatan bakteria pada permukaan gigi dan tisu mulut. Eugenol yang mengikat pada protein antigen I/II pada permukaan *S. mutans* dan bertindak balas terhadap kestabilan kompleks protein-ligan yang terbentuk [10]. *Streptococcus mutans* merupakan salah satu mikro flora mulut, oleh yang demikian protein permukaan bakteria ini iaitu adhesin P1 atau nama lainnya adalah protein antigen c (PAC), SpaP, antigen I/II dan B atau MSL-1 [11]. Protein ini membantu bakteria melekat pada permukaan gigi manusia melalui interaksi dengan pelikel liur.



Rajah 1. Kompleks lisozim-eugenol



Rajah 2. Kompleks Adhesin P1-eugenol

Kajian lanjutan dicadangkan bagi menguji keberkesanan jangka panjang penggunaan cengkih dalam populasi lebih besar kerana hasil kajian ini terhad kepada satu subjek sahaja. Keduanya adalah untuk menilai formulasi kumuran berasaskan ekstrak cengkih sebagai produk semula jadi dalam penjagaan mulut.

4. Conclusions

Cengkih menunjukkan kesan pengurangan bilangan bakteria dalam air liur secara signifikan. Aktiviti antibakteria eugenol disokong melalui analisis in siliko yang menunjukkan potensi meningkatkan fungsi enzim lisozim yang merupakan pertahanan semula jadi dan mengganggu protein adhesin P1 bakteria. Cengkih berpotensi digunakan sebagai alternatif semula jadi kepada bahan kumur komersial untuk penjagaan kesihatan mulut.

Acknowledgement

Kajian ini dibiayai oleh Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

References

- [1] Pandey, A. and Singh, P. "Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne-food-borne pathogens." *Asian Journal of Plant Science and Research* 1, no. 2 (2011): 69–80.
- [2] Parle, Milind. & Deepa, K. (2016). Clove: a champion spice. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 2(1): 47–54.
- [3] Hosseini, M., Kamkar Asl, M. and Rakhshandeh, H. (2011). Analgesic effect of clove essential oil in mice. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 1: 1-6.
- [4] Haraszthy, V.I., Zambon, J.J., Trevisan, M., Zeid, M. and Genco R.J. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *Journal of Periodontology* 71, no 10 (2000):1554-1560. doi: 10.1902/jop.2000.71.10.1554.
- [5] Zhou, X. & Li, Y. (2015). Techniques for Oral Microbiology. *Atlas of Oral Microbiology*: 15–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1>
- [6] Kreth, J., Merritt, J. and Qi, F. (2009). Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA and Cell Biology* 28(8): 397–403. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0868>
- [7] Smith, A.J., Jackson, M.S. and Bagg, J. "The ecology of *Staphylococcus* Species in the Oral Cavity. *Journal of Medical Microbiology* 50, no. 11 (2001): 940–946. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-11-940>
- [8] Hemaiswarya, S. and Doble, M. "Synergistic Interaction of Eugenol With Antibiotics Against Gram Negative Bacteria." *Phytomedicine* 16, no 11 (2009): 997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>

- [9] Ulanowska, M. and Olas, B. "Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review." *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 7 (2021): 3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- [10] Mostafa, N.M. "Antibacterial Activity of Ginger (*Zingiber Officinale*) Leaves Essential Oil Nanoemulsion Against the Cariogenic *Streptococcus Mutans*." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8, no 9 (2018): 34–41. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8906>
- [11] Matsumoto-Nakano, M. "Role of *Streptococcus Mutans* Surface Proteins for Biofilm Formation." *Japanese Dental Science Review* 54, no. 1 (2018): 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.08.002>