

KARYA TULIS ILMIAH

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR DAN
NONPOLAR EKSTRAK ETANOLIK BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.)
TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* SECARA
IN VITRO DAN *IN SILICO***

Disusun Untuk Memenuhi Syarat Memperoleh Derajat Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta



Disusun Oleh

Rizki Amalia Rahmah

20110350040

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA**

2015

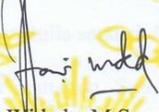
HALAMAN PENGESAHAN KTI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR DAN
NONPOLAR EKSTRAK ETANOLIK BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.)
TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* SECARA
IN VITRO DAN *IN SILICO*

Disusun oleh:
RIZKI AMALIA RAHMAH
20110350040

Telah Disetujui dan diseminarkan pada tanggal 27 Agustus 2015

Dosen Pembimbing


Hari Wildada, M.Sc., Apt.
NIK: 1977 0721 201004 173120

Dosen Penguji 1

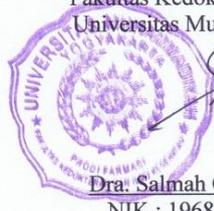

Sabtanti Hari Murti, Ph.D., Apt
NIK: 1973 0223 201310 173127

Dosen Penguji 2


Rifki Febriansah, M.Sc., Apt
NIK: 1987 0227 201210 173188

Mengetahui,

Ketua Program Studi Farmasi
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta




Dra. Salmah Otbayinah, M.Kes., Apt
NIK : 1968 0229 199409 173008

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Rizki Amalia Rahmah

Nomor Induk Mahasiswa : 20110350040

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

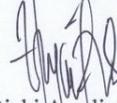
Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Karya Tulis Ilmiah yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya tulis sendiri dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka di bagian akhir Karya Tulis Ilmiah ini.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan Karya Tulis Ilmiah ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Yogyakarta, 27 Agustus 2015

Yang membuat pernyataan,

Tanda Tangan



Rizki Amalia Rahmah

NIM : 20110350040

HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN

MOTTO

I am thankful to all those who said NO to me, it's because of them I did it myself.

-Einstein-

PERSEMBAHAN

Karya Tulis Ilmiah ini saya persembahkan untuk :

Ibunda dan Ayahanda tercinta yang telah memberikan kasih sayang, segala dukungan dan cinta kasih yang tiada terhingga yang tiada mungkin dapat kubalas dengan selembar kertas yang bertuliskan kata cinta dan persembahan.

Untuk adik-adikku terimakasih atas doa dan bantuannya selama ini, maaf belum bisa menjadi panutan seutuhnya, tapi aku akan selalu menjadi yang terbaik untuk kalian semua.

Sahabat-sahabatku terima kasih atas bantuan doa, nasehat, hiburan dan semangat yang kalian berikan selama aku kuliah, aku tidak akan melupakan semua yang telah kalian berikan selama ini.

Dan semua pihak yang sudah membantu selama penyelesaian KTI ini.

“Your dreams today, can be your future tomorrow”

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr.Wb

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Polar, Semipolar dan Nonpolar Ekstrak Etanolik Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* secara *In Vitro* dan *In Silico*”. Penulisan Karya Tulis Ilmiah ini dimaksudkan untuk memenuhi syarat memperoleh gelar derajat Sarjana Farmasi pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Penulis menyadari semua penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini tidak lepas dari bantuan oleh berbagai pihak, untuk itu dengan segala keikhlasan hati penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Allah SWT atas limpahan berkah, rahmah dan hidayah-Nya
2. dr. H. Ardi Pramono, Sp.An., M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang telah memberi izin dalam pelaksanaan Karya Tulis Ilmiah ini.
3. Dra. Salmah Orbayinah M.Kes., Apt selaku Ketua Program Studi Farmasi yang telah memberi izin dalam pelaksanaan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Hari Widada, M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dan arahan yang berharga dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini.

5. Sabtanti Harimurti, Ph.D., Apt selaku Dosen Penguji 1 dan Rifki Febriansah, M.Sc., Apt selaku Dosen Penguji 2 yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
6. Seluruh dosen Program Studi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang telah memberikan pengarahan kepada penulis dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
7. Keluargaku tercinta, Ayah, Ibu, adik-adik dan keluarga besarku yang telah memberikan kasih sayang, doa, serta nasihat-nasihat kepada penulis dalam melaksanakan penelitian ini.
8. Sahabat-sahabat tercinta Puput, Shifa, Septi, Reny, Ely dan Sita yang selalu memberikan dukungan, semangat serta masukan dalam membantu penelitian ini baik secara langsung maupun tidak langsung. Terimakasih sahabat terbaikku. Semoga semua impian kita dapat terwujud.
9. Teman-teman sebimbingan KTI Linda, Mala, Alham, Dino, Sosha dan teman-teman seperjuangan angkatan 2011 atas semangat dan kebersamaannya selama ini.
10. Semua pihak yang tidak dapat ditulis satu persatu yang telah membantu Karya Tulis Ilmiah ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya membangun sangat diharapkan. Semoga karya tulis ini nantinya dapat bermanfaat bagi penulis, pembaca, serta kemajuan ilmu pengetahuan di bidang kesehatan pada umumnya

dan menambah pengetahuan di bidang kesehatan masyarakat pada khususnya.

Amin.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Yogyakarta, 27 Agustus 2015

Penulis

DAFTAR ISI

KARYA TULIS ILMIAH.....	i
HALAMAN PENGESAHAN KTI.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN.....	iii
HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. RUMUSAN MASALAH.....	3
C. KEASLIAN PENELITIAN.....	4
D. TUJUAN PENELITIAN.....	5
E. MANFAAT PENELITIAN.....	6
1. Bagi Penulis dan Kalangan Peneliti.....	6
2. Bagi Masyarakat Secara Umum.....	6
BAB II.....	7
TINJAUAN PUSTAKA.....	7
A. BAWANG PUTIH (<i>Allium sativum</i> L.).....	7
1. Klasifikasi Bawang Putih.....	7
2. Karakteristik.....	7
3. Kandungan Kimia.....	8
4. Manfaat Bawang Putih.....	9
5. Aktivitas Antibakteri Bawang Putih.....	10
B. <i>Escherichia coli</i>	11
C. SIPROFLOKSASIN.....	15
D. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI.....	17
1. Metode difusi.....	18
2. Metode dilusi.....	20
E. EKSTRAKSI.....	21
F. ANALISIS GC-MS.....	22
G. <i>MOLECULAR DOCKING</i>	24
H. KERANGKA KONSEP.....	27
I. HIPOTESIS.....	28
BAB III.....	30
METODE PENELITIAN.....	30
A. Desain Penelitian.....	30
B. Tempat dan Waktu Penelitian.....	30
C. Identifikasi Variabel Penelitian.....	30
D. Definisi Operasional.....	31

1.	Daya Antibakteri	31
2.	Diameter Zona Inhibisi.....	31
3.	Kadar Hambat Minimum (KHM)	31
4.	<i>Docking Score</i>	32
E.	Instrumen Penelitian	32
1.	Alat Penelitian	32
2.	Bahan.....	32
F.	Cara Kerja	33
1.	Penyiapan Bahan untuk Ekstraksi	33
2.	Pembuatan Ekstrak Etanolik Bawang Putih.....	33
3.	Fraksinasi Ekstrak	33
4.	Sterilisasi Alat dan Bahan	34
5.	Pembuatan Kontrol Positif	35
6.	Pembuatan Kontrol Negatif.....	35
7.	Pembuatan Media Pertumbuhan.....	35
8.	Pembuatan Larutan Uji.....	36
9.	Pembuatan Stok Bakteri	37
10.	Pembuatan Suspensi Bakteri	37
11.	Pengujian Aktivitas Antibakteri	37
12.	Pengamatan Zona Inhibisi	38
13.	Analisis GCMS (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>).....	38
14.	Uji <i>Molecular Docking</i> dengan AutoDockTools	39
15.	Alur Penelitian.....	41
G.	Analisis Hasil Penelitian	44
BAB IV	46
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	46
A.	Hasil Penelitian	46
B.	Pembahasan	62
BAB V	73
KESIMPULAN DAN SARAN	73
A.	Kesimpulan	73
B.	Saran	73
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	82

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Nilai DZI fraksi metanol terhadap pertumbuhan <i>E. coli</i>	49
Tabel 2. Nilai DZI fraksi etilasetat terhadap pertumbuhan <i>E. coli</i>	50
Tabel 3. Nilai DZI fraksi heksana terhadap pertumbuhan <i>E. coli</i>	50
Tabel 4. Hasil uji aktivitas antibakteri kontrol positif (siprofloksasin 5 µg) dan kontrol negatif (aquadest steril dan aquadest steril + span 80) terhadap inhibisi pertumbuhan <i>E. coli</i>	51
Tabel 5. Senyawa Organosulfur Fraksi Etilasetat	53
Tabel 6. Senyawa Organosulfur Fraksi Heksana	54
Tabel 7. Visualisasi Ligan	57
Tabel 8. Interaksi Ligan dengan Protein Target.....	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Bawang Putih (<i>Allium sativum</i> L.)	7
Gambar 2. Struktur <i>Escherichia coli</i>	13
Gambar 3. Rumus Bangun Sipprofloksasin	15
Gambar 4. <i>Docking</i> Antara Enzim dan Ligan	26
Gambar 5. Skema Kerangka Konsep	28
Gambar 6. Alur Penelitian.....	41
Gambar 7. Skema Langkah Kerja Uji Aktivitas Antibakteri	42
Gambar 8. Skema Langkah Kerja Secara Umum	43
Gambar 9. Diagram Perbandingan rata-rata DZI pada masing-masing fraksi.....	48
Gambar 10. Kromatogram Fraksi Etilasetat.....	53
Gambar 11. Kromatogram Fraksi Heksana.....	54
Gambar 12. Visualisasi Sisi Aktif DNA Gyrase Subunit B.....	56
Gambar 13. Interaksi 3D antara (a) Dialil disulfida (b) Dialil trisulfida dengan DNA gyrase subunit B	61
Gambar 14. Interaksi 3D antara (c) Dialil tetrasulfida (d) <i>Allicin</i> dengan DNA gyrase subunit B	61
Gambar 15. Interaksi 3D antara (e) <i>Diethyl mercaptole</i> (f) <i>2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin</i> dengan DNA gyrase subunit B.....	61
Gambar 16. Interaksi 3D antara (g) Sipprofloksasin (h) Ref ligan dengan DNA gyrase subunit B	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Determinasi	83
Lampiran 2. Hasil Analisis Data dengan SPSS.....	84
Lampiran 3. Kondisi GC-MS	86
Lampiran 4. Kromatogram Fraksi Etilasetat	87
Lampiran 5. Kromatogram Fraksi Heksana	88
Lampiran 6. Hasil <i>Mass Spectrometer</i> Fraksi Etilasetat	89
Lampiran 7 Hasil <i>Mass Spectrometer</i> Fraksi Heksana	92
Lampiran 8. Konformasi Hasil <i>Molecular Docking</i>	94
Lampiran 9. Visualisasi 3D Interaksi Antara Dialil disulfida dengan DNA gyrase subunit B	98
Lampiran 10. Visualisasi 3D Interaksi Antara Dialil trisulfida dengan DNA gyrase subunit B	98
Lampiran 11. Visualisasi 3D Interaksi Antara Dialil tetrasulfida dengan DNA gyrase subunit B	99
Lampiran 12. Visualisasi 3D Interaksi Antara <i>Allicin</i> dengan DNA gyrase subunit B	99
Lampiran 13. Visualisasi 3D Interaksi Antara <i>Diethyl mercaptole</i> dengan DNA gyrase subunit B	100
Lampiran 14. Visualisasi 3D Interaksi Antara <i>2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin</i> dengan DNA gyrase subunit B	100
Lampiran 15. Visualisasi 3D Interaksi Antara Siprofloksasin dengan DNA gyrase subunit B	101
Lampiran 16. Visualisasi 3D Interaksi Antara Ref ligan dengan DNA gyrase subunit B	101
Lampiran 17. Hasil Foto Penelitian	102

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR DAN
NONPOLAR EKSTRAK ETANOLIK BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.)
TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* SECARA *IN VITRO* DAN *IN*
SILICO

INTISARI

Pengobatan dengan menggunakan tanaman herbal telah banyak digunakan oleh masyarakat. Salah satu tanaman yang bermanfaat untuk pengobatan adalah bawang putih (*Allium sativum* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak etanolik bawang putih yang terfraksinasi terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro* dan *in silico*.

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan dilanjutkan proses fraksinasi menggunakan tiga pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda (metanol, etilasetat, dan heksana). Hasil ekstraksi dan fraksinasi didapatkan ekstrak kental sebesar 2,3 kg, fraksi metanol 219,7 g, fraksi etilasetat 2,47 g dan fraksi heksana sebesar 2,33 g. Setiap fraksi dibagi menjadi enam konsentrasi (1%, 5%, 10%, 25%, 50% dan 75%) dan menjadi sampel untuk pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode Kirby-Bauer atau *Disk Diffusion*. Ekstrak yang menunjukkan hambatan secara signifikan pada uji antibakteri dilakukan analisis kandungan dengan metode GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Senyawa organosulfur yang terdeteksi dilakukan analisis secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking* terhadap DNA gyrase subunit B.

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ketiga fraksi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Hasil uji deskriptif diketahui bahwa fraksi heksana memiliki aktivitas yang paling poten dengan adanya DZI tertinggi ($9,333 \pm 2,065$). Rata-rata nilai DZI dari yang terkecil hingga terbesar berturut-turut adalah fraksi heksana ($9,333 \pm 2,065$), fraksi etilasetat ($7,383 \pm 1,077$) dan fraksi metanol ($2,166 \pm 3,371$). Data ini menunjukkan bahwa fraksi etilasetat dan fraksi heksana lebih signifikan ($P < 0,05$) daripada fraksi metanol. Analisis GC-MS terhadap fraksi etilasetat dan heksana menunjukkan adanya senyawa organosulfur seperti *allicin*, dialil disulfida, dialil trisulfida, dialil tetrasulfida, *diethyl mercaptole* dan *2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin*. Uji *in silico* senyawa-senyawa organosulfur tersebut dengan target DNA gyrase subunit B menunjukkan adanya afinitas dalam efek antibakteri. Senyawa organosulfur yang memiliki nilai *binding energy* paling rendah adalah senyawa *2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin* sebesar $-4,07$ kkal/mol dan *allicin* sebesar $-4,0$ kkal/mol. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi heksana dan fraksi etilasetat memiliki aktivitas antibakteri yang baik dengan uji secara *in vitro* dan *in silico*.

Kata Kunci : *Allium sativum* L, *Escherichia coli*, Fraksi, Aktivitas Antibakteri, GC-MS, *Molecular Docking*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF POLAR, SEMIPOLAR AND
NONPOLAR FRACTION GARLIC (*Allium sativum* L.) ETHANOLIC
EXTRACT AGAINST *ESCHERICHIA COLI* BY *IN VITRO* AND *IN SILICO*
ASSAY

ABSTRACT

Treatment with herbs has been widely used by the public. One of the plants that are useful for treatment is garlic (*Allium sativum* L.). This study aimed to evaluate the antibacterial activity of garlic extract ethanolic against *Escherichia coli* by *in vitro* and *in silico* test.

The extraction process performed by maceration method and continued by fractionation process using three solvents with different polarity level (methanol, ethyl acetate and hexane). Extraction and fractionation results obtained of thick extract is 2.3 kg, 219,7 g of methanol fraction, 2,47 g of ethyl acetate fraction and 2,33 g of hexane fraction. Each fraction was divided into six concentration (1%, 5%, 10%, 25%, 50%, and 75%) and be the sample for antibacterial activity testing by Kirby-Bauer or Disk Diffusion method. Extract that showed significant inhibition in antibacterial study was conducted for composition analysis by GC-MS method (Gas Chromatography-Mass Spectrometry). Detected organosulfur compounds were analyzed by *in silico* with molecular docking method against DNA gyrase subunit B.

The result showed that three fraction have antibacterial activity against *E. coli*. Descriptive test result is known that the hexane fraction has the most potent activity with the highest DZI (9.333 ± 2.065). Average values of DZI from the smallest to the largest consecutive is hexane fraction (9.333 ± 2.065), ethyl acetate fraction (7.383 ± 1.077) and methanol fraction (2.166 ± 3.371). These data indicate that ethyl acetate and hexane fraction is more significant ($P < 0,05$) than methanol fraction. GC-MS analysis of ethyl acetate and hexane fraction showed the presence of organosulfur compounds such as diallyl disulfide, diallyl trisulfide, diallyl trisulfide, diallyl tetrasulfide, diethyl mercaptole and 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin. Organosulfur compound which has the lowest value of binding energy is 2-vinyl- [4H]-1,3-dithiin amounted to -4.07 kcal/mol and allicin amounted to -4.0 kcal/mol. *In silico* test of these organosulfur compounds showed there affinity in antibacterial effects against DNA gyrase subunit B. The result of this study indicate that hexane and ethyl acetate fraction had a good antibacterial activity by *in vitro* and *in silico* test.

Keywords : *Allium sativum* L, *Escherichia coli*, Fraction, Antibacterial Activity, GC-MS, Molecular Docking

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Penyakit infeksi merupakan penyakit umum yang mudah sekali menyerang manusia. Infeksi adalah suatu proses invasi dan pembiakan mikroorganisme yang terjadi di jaringan tubuh manusia. Secara klinis mungkin tidak terlihat atau dapat menimbulkan cedera seluler lokal akibat kompetisi metabolisme, toksin, replikasi intrasel atau respon antigen-antibodi (Dorland, 2002). Salah satu agen penyebab infeksi adalah bakteri *Escherichia coli*.

Prevalensi infeksi karena *E. coli* sangat tinggi di negara berkembang dengan perkiraan angka kejadian lebih dari 100 kasus per 100.000 penduduk (WHO, 2006). Manifestasi klinik infeksi oleh *E. coli* bergantung pada tempat infeksi dan sulit untuk dapat dibedakan dengan gejala infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain (Jawetz, *et al.*, 1995). Di sisi lain, resistensi bakteri merupakan masalah kesehatan yang dihadapi dunia pada saat ini termasuk di Indonesia. Penggunaan antibiotika yang berlebihan menyebabkan jumlah kuman patogen yang resisten meningkat salah satu diantaranya adalah *E. coli*. Keadaan tersebut semakin mempersulit pengobatan penyakit infeksi. Menurut hasil penelitian Refdanita (2004) diketahui bahwa *E. coli* resisten terhadap antibiotika golongan kloramfenikol sebesar 83,9%, dan amoksisilin sebesar 86,2%. Semakin besar presentase resistensi bakteri terhadap suatu antibiotik menyatakan bahwa bakteri tidak lagi rentan terhadap antibiotik tersebut. Masalah resistensi bakteri ini semakin mendorong para pakar farmakologi untuk menggali sumber antibakteri

dari bahan alam. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai antibakteri adalah bawang putih. Selain itu dalam Al-Qur'an juga disinggung mengenai tanam-tanaman yang merupakan suatu anugerah bagi makhluk hidup dan merupakan salah satu tanda kekuasaan Allah SWT. Herba terbaik tentunya ialah herba yang dianjurkan oleh Rasulullah SAW, *habbatusaudah*, minyak zaitun, dan termasuk tanaman-tanaman obat lain yang tumbuh disekitar kita. Rasulullah pernah bersabda "*tidaklah suatu penyakit diturunkan melainkan Allah juga menyertakan obat-obatnya*" (HR. Bukhori). Di dalam kitab suci Al-Qur'an, terdapat ayat-ayat Allah yang berhubungan dengan tanaman obat dan memerintahkan manusia untuk menggunakannya.

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ
كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

"Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkkan". (QS. AnNahl [16] : 11).

Dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antibakteri fraksi polar, semipolar dan nonpolar ekstrak etanolik bawang putih terhadap bakteri *E. coli* secara *in vitro* dan *in silico* menggunakan *docking*. Variasi konsentrasi ekstrak berpengaruh dalam penghambatan optimum melalui penetapan KHM (Kadar Hambat Minimum) yang diinterpretasikan dengan nilai DZI (*Diameter Zone Inhibition*). Selain itu diperlukan variasi pelarut yang dimaksudkan untuk memperoleh fraksi senyawa aktif yang lebih murni dibandingkan dengan ekstrak

kasar. Uji kualitatif dilakukan dengan metode analisis GC-MS untuk memisahkan komponen yang diinginkan dari suatu campuran dan mengidentifikasi komponen tersebut yang dapat dibandingkan langsung dengan standar pada perangkat lunak (*software*). Selain uji *in vitro*, juga dilakukan uji *in silico* dengan menggunakan *docking*. *Molecular docking* atau penambatan molekul merupakan suatu metode komputasi yang digunakan untuk menggambarkan interaksi antara suatu molekul sebagai ligan dengan suatu reseptor atau protein. Secara umum, tujuan dari studi *docking* adalah membuat pemodelan struktur yang akurat dan prediksi aktivitas yang tepat. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat tentang aktivitas antibakteri yang dimiliki bawang putih terhadap *E. coli*.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang masalah di atas maka dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah masing-masing fraksi ekstrak etanolik bawang putih mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* secara *in vitro*?
2. Apakah fraksi ekstrak yang terbukti signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* memiliki kandungan senyawa organosulfur dengan analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)?
3. Apakah senyawa organosulfur yang terdeteksi dengan analisis GC-MS memiliki afinitas dalam menghambat protein DNA gyrase subunit B secara *molecular docking*?

C. KEASLIAN PENELITIAN

Penelitian menggunakan larutan uji ekstrak etanol bawang putih dan di fraksinasi dengan pelarut etilasetat, heksana dan metanol untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *E. coli*. Penelitian yang dilakukan oleh Lingga (2010) mengenai uji aktivitas antibakteri ekstrak air dan etanol pada bawang putih terhadap bakteri yang diisolasi dari udang yaitu *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Clostridium sp*, *Bacillus sp*, *Erysipelothrix sp*, *Corynebacterium sp*, *Vibrio sp* dan *Plesiomonas sp*, menunjukkan bahwa ekstrak air bawang putih dan ekstrak murni bawang putih yang dilarutkan dalam air lebih bersifat antibakteri terhadap bakteri gram positif terutama pada *Streptococcus*, sedangkan pada bakteri gram negatif, terjadi pada *Pleisomonas*. Ekstrak etanol bawang putih juga bersifat antibakteri terutama pada bakteri gram positif terjadi pada *Clostridium* dan pada bakteri gram negatif yang masih peka terhadap ekstrak murni bawang putih dengan pelarut etanol adalah *Pleisomonas*.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Inawati (2011), tentang pengaruh ekstrak etanol bawang putih terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*, *Salmonella thypi* dan *E. coli*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa bawang putih mempunyai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sebesar 0,9% untuk pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*, bakteri *Salmonella typhi* pada konsentrasi 0,8%, dan bakteri *E. coli* sebesar 0,8%.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Sihombing (2015) mengenai ekstrak air bawang putih dan hasil hidrolisis minyak kelapa murni terhadap bakteri penyebab diare. Hasil penelitian menunjukkan VCOT (*Virgin Coconut Oil* tanpa hidrolisis)

tidak efektif sebagai antibakteri namun meningkat setelah dihidrolisis (HVCO) dan lebih efektif terhadap bakteri gram positif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*). EABP (ekstrak air bawang putih) memiliki aktivitas antibakteri paling besar dibandingkan VCOT dan HVCO serta efektif terhadap bakteri gram positif dan negatif (*E. coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholera*). Namun kombinasi VCOT dan HVCO dengan EABP tidak memberikan efek sinergisme.

Penelitian ini berbeda dengan penelitian-penelitian lain yang pernah dilakukan karena dalam penelitian ini digunakan berbagai macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda sehingga didapatkan fraksi ekstrak bawang putih yang lebih spesifik. Penelitian ini juga menggunakan metode GC-MS untuk mendeteksi senyawa organosulfur yang terdapat dalam ekstrak bawang putih dan dilakukan juga analisis lanjutan dengan menggunakan *molecular docking*.

D. TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui konsentrasi efektif dari masing-masing fraksi ekstrak bawang putih dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*.
2. Mengetahui kandungan senyawa organosulfur terhadap fraksi ekstrak yang terbukti signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dengan metode GC-MS.
3. Mengetahui afinitas masing-masing senyawa organosulfur yang terdeteksi melalui analisis GC-MS dalam menghambat protein DNA gyrase subunit B secara *molecular docking*.

E. MANFAAT PENELITIAN

1. Bagi Penulis dan Kalangan Peneliti

- a) Dapat digunakan sebagai landasan ilmiah untuk penelitian berikutnya mengenai kemanfaatan bawang putih sebagai penghambat pertumbuhan *E. coli*.
- b) Menambah wawasan dan pengetahuan peneliti tentang aktivitas antibakteri dalam suatu tanaman bawang putih terhadap *E. coli*.
- c) Mengidentifikasi komponen apa saja yang terdapat dalam ekstrak bawang putih dengan menggunakan GC MS.

2. Bagi Masyarakat Secara Umum

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi bagi masyarakat mengenai pemanfaatan bawang putih dalam pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *E. coli*, salah satunya diare.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.)

1. Klasifikasi Bawang Putih

- Divisio : Spermatophyta
Sub divisio : Angiospermae
Kelas : Monocotyledonae
Bangsa : Liliales
Suku : Liliaceae
Marga : *Allium*
Jenis : *Allium sativum* L
Nama umum : Bawang putih (Barnes, 2002)



Gambar 1. Bawang Putih (*Allium sativum* L.) (Sumber : Rignanese, 2005)

2. Karakteristik

Bawang putih termasuk dalam suku *Liliaceae* dan merupakan tanaman berumpun yang bersiung-siung. Bawang putih digunakan oleh masyarakat

untuk menurunkan tekanan darah, mengurangi rasa pening di kepala, mengatasi cacingan, menghilangkan nyeri haid, mengatasi asma, batuk, masuk angin, dan sengatan binatang (Sudjarwo, *et al.*, 2004). Bawang putih memiliki karakteristik daun berbentuk pipih dan berwarna hijau, berbentuk pita (pipih memanjang), dengan tepi rata, ujung runcing, panjang 60 cm dan lebar 1,5 cm. Batang semu, beralur dan berwarna hijau, bagian bawah bersiung-siung dan bergabung menjadi umbi besar berwarna putih. Bawang putih termasuk herba (semak), semusim, dan tinggi 50-60 cm. Bunga berwarna putih, bertangkai panjang dan bentuknya payung dan memiliki akar serabut (Barnes, 2002)

3. Kandungan Kimia

Komponen kimia pada bawang putih mengandung sulfur. Sulfur merupakan komponen penting yang terkandung dalam bawang putih. Adapun komponen sulfur adalah berupa *alliin*, *allicin*, *ajoene*, *allylpropyl disulfide*, dialil trisulfida, *s-alilcysteine*, *vinylthiines*, *s-alilmercaptocystein* dan lain-lain (Omar dan Al-Wabel, 2009). Selain sulfur kandungan bawang putih lainnya juga adalah berupa enzim *alliinase*, peroksidase, myrosinase, asam amino berupa arginine; komponen lain seperti selenium, germanium, tellurium dan mineral lainnya (Kemper, 2000). *Allicin* yang terkandung dalam bawang putih mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Wiryanan, *et al.*, 2005).

Senyawa yang diduga berperan sebagai antibakteri adalah senyawa-senyawa *Thiosulfinates*, misalnya adalah *allicin* (Hughes and Lawson, 1991).

Allicin akan terbentuk ketika *alliin* [(+)-(S)-*alil-L-cysteine-sulfoxide*] secara enzimatis dirubah oleh enzim *alliinase* ketika bawang putih dicincang, dihancurkan, maupun dikunyah. Kompleks *alliin* dengan enzim *alliinase* akan terbentuk dengan adanya air. Senyawa ini tidak stabil dan mengalami reaksi dehidrasi oleh *pyridoxal phosphate* dan bertransformasi menjadi *allyl sulfenic acid*, *pyruvic acid*, dan amonia. *Allyl sulfenic acid* merupakan senyawa yang tidak stabil dan sangat reaktif pada suhu ruangan. Dengan reaksi eliminasi air, maka dua molekul *allyl sulfenic acid* mengalami kondensasi secara spontan menjadi *allicin* (Ilic, *et al.*, 2011).

Hasil penelitian Lingga (2010), menyatakan bahwa seluruh bentuk ekstrak bawang putih mengandung tanin, alkaloid, dan saponin. Alkaloid umum terkandung pada berbagai bahan makanan (Sadikin, 2002). Beberapa jenis tumbuhan yang mengandung lebih dari 50 macam alkaloid antara lain dari suku *Liliaceae*. Bawang putih termasuk ke dalam suku *Liliaceae* yang kaya akan kandungan alkaloid (Lingga, 2010).

4. Manfaat Bawang Putih

Bawang putih memiliki manfaat sebagai ekspektoran, antispasmodik, antiseptik, bakteriostatik, antiviral dan antihelminitik (Lingga, 2010). Secara tradisional bawang putih digunakan untuk mengobati bronkhitis kronis, batuk, asma dan influenza. Secara modern bawang putih digunakan sebagai antihipertensi, antitrombotik, antimikroba, fibrinolitik, imunomodulator dan pencegah kanker (Barnes, 2002). Bawang putih juga memiliki sifat antihelminitik dan mengurangi faktor resiko peningkatan kadar gula darah

yang disebabkan nikotin atau hiperkolesterolemia (Utami, 2012). Penelitian Yamada dan Azama (1997) menyatakan bahwa selain memiliki sifat sebagai antibakteri bawang putih juga bersifat sebagai antijamur.

5. Aktivitas Antibakteri Bawang Putih

Senyawa *allicin* yang terkandung dalam bawang putih menunjukkan aktivitas antimikroba dengan menghambat sintesis RNA dengan cepat dan menyeluruh (Feldberg, *et al.*, 1988). Perbedaan struktur bakteri juga berperan dalam kerentanan bakteri terhadap unsur bawang putih. Membran sel *E. coli* terdiri atas 20% lipid, dimana *Staphylococcus aureus* hanya terdiri atas 2% lipid. Kandungan lipid pada membran dapat mempengaruhi permeabilitas *allicin* dan unsur bawang putih yang lain (Tattleman, 2005).

Mekanisme antibakteri senyawa *allicin* diduga dengan menghambat sintesis RNA secara total dan menghambat sintesis DNA dan protein secara parsial (Feldberg, *et al.*, 1988). Bawang putih juga mempunyai kandungan senyawa lain disamping *allicin* yaitu saponin dan flavonoid yang sama-sama berfungsi sebagai antibakteri (Griffiths, *et al.*, 2002). Dalam referensi lain disebutkan bahwa mekanisme antibakteri bawang putih adalah dengan menghambat enzim transpeptidase yang terlibat dalam *cross-linking* dari rantai polisakarida dinding sel bakteri sehingga menghambat pembentukan dinding sel bakteri (Prescott, *et al.*, 2005). Selain itu juga dapat menghambat DNA gyrase bakteri sehingga mengganggu transkripsi DNA dan aktivitas lain yang melibatkan DNA bakteri (Prescott, *et al.*, 2005)

Saponin adalah senyawa aktif yang kuat dan menimbulkan busa jika digosok dalam air sehingga bersifat seperti sabun dan mempunyai kemampuan antibakterial (Robinson, 1995). Saponin dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga dapat mengubah struktur dan fungsi membran, menyebabkan denaturasi protein membran sehingga membran sel akan rusak dan lisis (Sumthong dan Verpporte, 2012). Menurut Volk dan Weller (1989), saponin memiliki molekul yang dapat menarik air atau hidrofilik dan molekul yang dapat melarutkan lemak atau lipofilik sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang akhirnya menyebabkan kehancuran kuman.

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bersifat desinfektan yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein. Akibatnya aktifitas metabolisme sel bakteri dapat terhenti, karena semua aktivitas metabolisme bakteri dikatalis oleh enzim (merupakan protein). Berhentinya aktifitas metabolisme ini akan mengakibatkan kematian sel bakteri. Flavonoid juga bersifat bakteriostatik yang bekerja melalui penghambatan sintesis dinding sel bakteri (Robinson, 1995).

B. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri yang ditemukan oleh Theodor Escherich pada tahun 1885. Bakteri termasuk ke dalam golongan prokariota yang strukturnya lebih sederhana dari eukariota. Ciri khas dari golongan prokariota diantaranya: 1) tidak ada membran internal yang memisahkan nukleus dari sitoplasma; 2) perkembangbiakan dengan cara pembelahan biner; 3) dinding sel

mengandung mukopeptida yang memberikan kekakuan pada sel (Pelzcar & Chan, 1986).

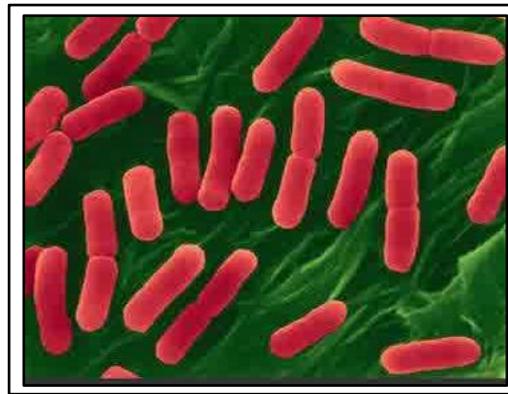
Bakteri berdasarkan pewarnaan gram, dibedakan menjadi bakteri gram negatif dan gram positif. Dinding sel bakteri gram positif banyak mengandung peptidoglikan, sedangkan dinding sel bakteri gram negatif banyak mengandung lipopolisakrida. Berdasarkan kebutuhan Oksigen (O₂) dikenal bakteri aerob dan anaerob. Bakteri aerob memerlukan O₂ untuk bernafas, sedangkan bakteri anaerob tidak memerlukan O₂ untuk bernafas (Irianto, 2006).

Escherichia coli atau biasa disingkat *E. coli*, adalah salah satu jenis spesies utama bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna merah sedangkan bakteri gram positif akan berwarna ungu bila diamati dengan mikroskop. Perbedaan keduanya didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel dan dapat dinyatakan dengan prosedur pewarnaan gram. Kebanyakan spesies bakteri gram negatif bersifat patogen, yang berarti berbahaya bagi organisme inang (Pelzcar & Chan, 1986).

E. coli merupakan bakteri fakultatif anaerob, kemoorganotropik, mempunyai tipe metabolisme fermentasi dan respirasi. Pertumbuhan yang baik pada suhu optimal 37° C pada media yang mengandung 1% pepton sebagai sumber karbon dan nitrogen. *E. coli* memfermentasikan laktosa dan memproduksi indol yang digunakan pada makanan dan air (Anggraeni, 2012).

Secara garis besar klasifikasi bakteri *E. coli* berasal dari Filum *Proteobacteria*, Kelas *Gamma Proteobacteria*, Ordo *Enterobacteriales*, Familia

Enterobacteriae, Genus *Escherichia*, Spesies *Escherichia coli* (Bergey's, 2005). Secara morfologi *E. coli* berbentuk batang pendek, gemuk, berukuran 2,4 μm x 0,4 μm sampai 0,7 μm , gram negatif, tidak bersimpai, bergerak aktif dan tidak berspora. *E. coli* dapat bertahan hingga suhu 60° C selama 15 menit atau pada 55° C selama 60 menit (Pelzcar & Chan, 1986). Morfologi *E. coli* dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. *Escherichia coli* (Sumber : Smith-Keary, 1988)

Penyakit yang mungkin akan muncul akibat dari adanya bakteri *E. coli* adalah jenis-jenis penyakit yang dapat menular dengan mudah dari satu orang ke orang lain seperti diare, muntaber, dan mual-mual. Masa inkubasi bakteri *E. coli* sekitar 6-24 jam hingga akhirnya gejala semakin parah pada tubuh orang yang terjangkiti. Penyakit-penyakit yang ditimbulkan oleh *E. coli* berupa infeksi saluran kemih dengan gejala yang timbul berupa sering kencing, disuria, hematuria dan piuria. Infeksi piogenik seperti infeksi luka, peritonitis, kolesistis dan meningitis (Bonang, 1992). *E. coli* dan *Streptococcus* adalah penyebab utama meningitis pada bayi dan merupakan penyebab pada sekitar 40% kasus meningitis neonatal (Jawetz, *et al.*, 1996). *E. coli* diklasifikasikan oleh ciri khas sifat-sifat virulensinya

dan setiap kelompok menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda.

Ada empat kelompok galur *E. coli* yang patogen, yaitu :

a. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

EAEC dikaitkan dengan diare persisten (> 14 hari) dan khususnya terjadi di negara-negara berkembang (Nataro, 1998). Diare jenis ini biasanya cair, sekretorik dan tidak disertai demam atau muntah dengan masa inkubasi diperkirakan 20 sampai 48 jam (Benenson, 1995).

b. Enteropatogenik *E. coli* (EPEC)

EPEC dikaitkan dengan diare pada bayi dan menyebabkan diare berair atau berdarah (US FDA). EPEC merupakan penyebab utama diare pada bayi di negara-negara berkembang. Penularan EPEC yaitu melalui rute fekal-oral dengan masa inkubasi selama 9 jam pada orang dewasa (Benenson, 1995).

c. Enterotoksigenik *E. coli* (ETEC).

ETEC terkait dengan dua sindrom klinis utama yaitu diare wisatawan dan diare pada anak-anak di negara berkembang (Nataro, 1998). Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik pada manusia yaitu dengan pelekatan pada sel epitel usus kecil. Masa inkubasi pendek (14 sampai 50 jam) dan menimbulkan gejala berupa diare berair, biasanya tanpa darah atau lendir dan tidak menimbulkan demam. Infeksi ETEC dapat menyebabkan diare yang mirip dengan yang diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* (Benenson, 1995).

d. Enteroinvasif *E. coli* (EIEC)

EIEC merupakan penyakit yang paling sering terjadi pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju negara tersebut. EIEC

menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus. Pada sebagian kecil pasien, EIEC dapat menghasilkan penyakit yang mirip dengan shigellosis (disentri) (Nataro, 1998; Benenson, 1995). Disentri yang disebabkan oleh EIEC biasanya terjadi dalam waktu 12 sampai 72 jam. Penyakit ini ditandai dengan munculnya darah dan lendir dalam tinja, kram perut, muntah, demam, menggigil, dan malaise.

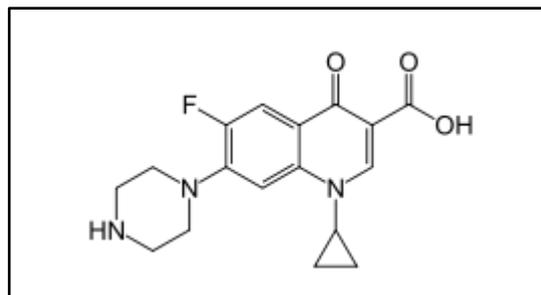
e. Enterohemoragik *E. coli* (EHEC)

Bakteri ini mengeluarkan toksin yang disebabkan edema dan perdarahan di kolon. Penyakit ini ditandai dengan kejang akut dan diare cair yang cepat menjadi berdarah (Jawetz, *et al.*, 1996).

C. SIPROFLOKSASIN

1. Sifat Fisikokimia

a) Struktur Kimia :



Gambar 3. Rumus Bangun Siprofloksasin (Sumber : *drugbank.com*)

b) Nama Kimia : *1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid*

c) Rumus Molekul : $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

d) Berat Molekul : 331,346

- e) Pemerian : serbuk kekuningan hingga berwarna kuning
- f) Kelarutan : dalam air pada suhu 25°C. Pka obat 6 dan 8,8

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon. Daya antibakteri fluorokuinolon jauh lebih kuat dibandingkan kelompok kuinolon lama. Flourokuinolon adalah antibiotik bakterisidal yang bekerja menghambat sintesis DNA dalam sel bakteri. Antibiotik ini memiliki penetrasi yang baik di dalam jaringan perut, termasuk mukosa usus, empedu dan cairan peritoneal. Flourokuinolon sangat efektif untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram positif maupun gram negatif khususnya *Enterobacteriaceae*. Contoh antibiotik golongan kuinolon adalah Ciprofloxacin, Enoxacin, Levofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Lomefloxacin, Moksifloxacin (Stringer, 2008). Selain itu kelompok obat ini diserap dengan baik pada pemberian oral dan beberapa derivatnya juga tersedia dalam bentuk parenteral sehingga dapat digunakan untuk penanggulangan infeksi berat khususnya yang disebabkan oleh bakteri gram negatif.

Secara intraseluler obat golongan ini menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara mengganggu kerja DNA girase (topoisomerase II) selama pertumbuhan reproduksi bakteri (Mycek, 2001). Pengikatan kuinolon pada enzim dan DNA untuk membentuk suatu kompleks menghambat langkah penggabungan kembali dan dapat menyebabkan kematian sel dengan menimbulkan keretakan DNA.

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon yang paling banyak digunakan karena bioavailabilitasnya yang baik dalam bentuk oral dan

intravena. Siprofloksasin diabsorpsi dengan baik melalui dosis oral dan cepat diekskresikan dari tubuh dalam kondisi normal. Siprofloksasin terutama berguna dalam mengobati infeksi-infeksi yang disebabkan oleh bermacam-macam *Enterobacteriaceae* dan basil gram negatif lainnya. Siprofloksasin merupakan suatu alternatif terhadap obat-obat yang lebih toksik seperti aminoglikosid dan bisa bekerja sinergis bersama obat-obat golongan beta laktam (Mycek, 2001).

D. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

Antibakteri diartikan sebagai bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri (Pelzcar & Chan, 1986). Zat antibakteri mempunyai sifat menghambat perkembangbiakan bakteri (bakteriostatik) dan sifat mematikan bakteri (bakterisidal) dalam menghentikan aktivitas sel bakteri. Penggunaan senyawa antimikroba khususnya yang alami, secara umum meningkat dari tahun ke tahun. Senyawa antimikroba yang terkandung dalam berbagai jenis ekstrak tanaman diketahui dapat menghambat beberapa mikroorganisme patogen maupun perusak pangan (Branen dan Davidson, 1993).

Senyawa antimikroba yang berasal dari tanaman, sebagian besar diketahui merupakan metabolit sekunder tanaman, terutama golongan fenolik dan terpena. Sebagian besar metabolit sekunder di biosintesis dari banyak metabolit primer seperti dari asam-asam amino, asetil ko-A, asam mevalonat dan metabolit antara (Herbert, 1995). Ditambahkan oleh Nychas dan Tassou (2000) beberapa senyawa bersifat antimikroba alami berasal dari tanaman diantaranya adalah fitoaleksin, asam organik, minyak essensial (atsiri), fenolik dan beberapa kelompok pigmen tanaman atau senyawa sejenis.

Mikroorganisme dapat menyebabkan infeksi, menimbulkan penyakit dan merusak bahan pangan. Senyawa antimikroba adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan dapat digunakan untuk penelitian pengobatan infeksi pada manusia maupun hewan. Antimikroba meliputi antifungi, antibakteri, antiprotozoa dan antivirus (Inayati, 2007).

Mekanisme penghambatan dan kerusakan mikroorganisme oleh senyawa antibakteri berbeda-beda. Penghambatan mikroba oleh senyawa antibakteri secara umum dapat disebabkan oleh: (1) gangguan pada komponen penyusun sel; terutama komponen penyusunan dinding sel, (2) reaksi dengan membran sel yang dapat mengakibatkan permeabilitas dan kehilangan komponen penyusun sel, (3) penghambatan terhadap sintesis protein dan (4) gangguan fungsi material genetik (Davidson, 2001). Menurut Kanazama, *et al.*, (1995) mekanisme terjadinya proses tersebut diatas disebabkan oleh adanya pelekatan senyawa antimikroba pada permukaan sel mikroba dan senyawa tersebut berdifusi ke dalam sel.

Aktivitas antimikroba dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode difusi dan dilusi. Pada metode difusi termasuk di dalamnya metode *disk diffusion* (tes Kirby & Bauer), *ditch-plate technique*, *cup-plate technique*. Sedangkan pada metode dilusi termasuk di dalamnya metode dilusi cair dan dilusi padat (Aziz, 2010).

1. Metode difusi

- a. Metode difusi cakram merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan antibakteri terhadap suatu antibiotik. Pada cara ini digunakan suatu cakram kertas saring (*paper disk*) yang berfungsi

sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji. Pada umumnya, hasil yang di dapat bisa diamati setelah inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Pelczar & Chan, 1988).

- b. Cara Parit (*Ditch-plate technique*). Pada metode ini lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat sebidang parit. Parit tersebut berisi zat antimikroba, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai untuk mikroba uji. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada tidaknya zona hambat yang akan terbentuk di sekitar parit (Bonang, 1992).
- c. Cara Sumuran (*Hole/Cup-plate technique*). Metode ini lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat suatu lubang yang selanjutnya diisi dengan zat antimikroba uji. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji, dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang (Bonang, 1992).
- d. Metode *E-test* atau biasa disebut dengan tes epsilometer adalah metode tes dimana huruf “E” dalam nama E-test menunjukkan simbol epsilon (ϵ). E-test merupakan metode kuantitatif untuk uji antimikroba. Metode ini

gabungan antara metode dilusi dan metode difusi antibakteri ke dalam media. Metode ini dilakukan dengan menggunakan strip plastik yang sudah mengandung agen antibakteri dengan konsentrasi terendah sampai tertinggi yang diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganismenya. Hambatan pertumbuhan mikroorganismenya bisa diamati dengan adanya area jernih di sekitar strip tersebut (Pratiwi, 2008).

2. Metode dilusi

a) Metode dilusi cair/*broth dilution test (serial dilution test)*. Pengujian dilakukan dengan menggunakan sederetan tabung reaksi yang diisi dengan inokulum kuman dan larutan antibakteri dalam berbagai konsentrasi. Zat yang akan diuji aktivitas bakterinya diencerkan sesuai serial dalam media cair, kemudian diinokulasikan dengan kuman dan diinkubasi pada waktu dan suhu yang sesuai dengan mikroba uji. Aktivitas zat ditentukan sebagai kadar hambat minimal (KHM) (Pratiwi, 2008).

b) Penipisan Lempeng Agar

Zat antibakteri diencerkan dalam media agar dan kemudian dituangkan ke dalam cawan petri. Setelah agar membeku, diinokulasikan bakteri kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Konsentrasi terendah dari larutan zat antibakteri yang masih memberikan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai kadar hambat minimal (Pratiwi, 2008).

Uji dilusi membutuhkan sejumlah kontrol, yaitu kontrol sterilitas, kontrol pertumbuhan dan uji secara simultan strain bakteri dengan KHM

yang sudah diketahui untuk menunjukkan bahwa seri pengenceran benar. Titik akhir uji dilusi biasanya tajam dan mudah didefinisikan (Smith, 2004).

E. EKSTRAKSI

Ekstraksi adalah suatu kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair. Pelarut yang baik harus memiliki kriteria harga murah, bersifat stabil, netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif dan tidak berpengaruh pada zat yang berkhasiat. Cairan pelarut yang ditetapkan dalam Farmakope Indonesia adalah air, etanol dan eter (Depkes RI, 1986). Proses ekstraksi bahan tanaman meliputi pengeringan & penyerbukan simplisia atau homogenisasi bagian tanaman segar; pemilihan penyari : polar (air, etanol, metanol), semipolar (etilasetat), nonpolar (heksana, petroleum eter, kloroform) dan pemilihan metode ekstraksi : maserasi, infundasi, soxhlet, destilasi (Sarker, *et al.*, 2006), pengepresan (*List & Schmidt*, 1986). Tujuan ekstraksi adalah untuk mendapatkan komponen kimia yang dikehendaki berdasarkan perbedaan kelarutan dalam suatu bahan kasar atau dalam simplisia. Bahan alam yang akan dilakukan ekstraksi umumnya dilakukan pengeringan dan dibuat dalam bentuk serbuk. Pengeringan dimaksudkan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama (Harborne, 1996).

Maserasi merupakan cara ekstrak yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan ekstrak. Cairan ekstrak akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat

aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan terpekat akan didesak keluar.

Depkes RI (1986) mengemukakan, etanol dipertimbangkan sebagai pelarut karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik dan dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan. Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sesuai dengan senyawa target. Umumnya maserasi dilakukan dengan cara 10 bagian serbuk simplisia dimasukkan dalam suatu bejana dan ditambahkan dengan 75 bagian pelarut, ditutup dan disimpan pada tempat yang terlindung cahaya matahari dan pada suhu ruangan (Ditjen POM, 1986).

Ekstraksi cair-cair atau *solvent extraction* merupakan proses pemisahan yang didasarkan atas perbedaan distribusi komponen yang dipisahkan antara dua fase cair (Febriyanti dkk, 2004). Proses pemisahan tersebut dilakukan di dalam dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Hal tersebut memungkinkan karena adanya sifat senyawa yang dapat terlarut dalam air maupun senyawa yang dapat larut dalam pelarut organik.

F. ANALISIS GC-MS

Kromatografi gas merupakan salah satu metode pemisahan yang baik dan dinamis untuk identifikasi semua jenis senyawa organik yang mudah menguap juga untuk melakukan analisis kualitatif dan kuantitatif suatu senyawa dalam suatu campuran. Prinsip kerja kromatografi gas adalah memisahkan solut-solut yang mudah menguap dan stabil terhadap panas yang bermigrasi melalui kolom

yang mengandung fase diam dengan suatu kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya. Pada umumnya solut akan terelusi berdasarkan titik didihnya, kecuali jika ada interaksi khusus antara solut dengan fase diam. Fase gerak yang berupa gas akan mengelusi solut dari ujung kolom lalu menghantarkannya ke detektor. Penggunaan suhu yang meningkat (biasanya 30-350°C) bertujuan untuk menjamin bahwa solut akan menguap sehingga akan cepat terelusi (Abdul Rahman dan Gandjar, 2011). Ada 2 jenis kromatografi gas yaitu kromatografi gas-cair dan kromatografi gas-padat. Kromatografi gas yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi gas-cair dengan fase geraknya adalah gas. Metode ini sering digunakan dalam identifikasi senyawa karena memberikan waktu retensi yang khas untuk senyawa yang berbeda. Kolom pada GC dibedakan menjadi 2 tipe yaitu kolom kapiler dan kolom paket. Kolom kapiler memiliki panjang antara 10 hingga 120 m dengan diameter internal 0,1 hingga 0,5 mm. Sedangkan kolom paket memiliki panjang antara 1 hingga 5 m dengan diameter internal 2 hingga 4 mm (Crawford Scientific, 2015). Kolom dalam GC berada dalam oven yang digunakan untuk mengatur suhu. Proses pemisahan yang terjadi dalam GC diawali dengan memasukkan sampel dalam instrumen melalui GC inlet kemudian sampel akan diuapkan dan dibawa ke kolom kromatografi oleh gas pembawa. Campuran senyawa dalam sampel selanjutnya akan dipisahkan berdasarkan karakteristik molekul dan interaksinya dengan fase diam yang berada dalam kolom GC (Douglas, 2015). Waktu retensi (*retention time*) adalah waktu yang dibutuhkan suatu senyawa hasil pemisahan untuk melewati kolom.

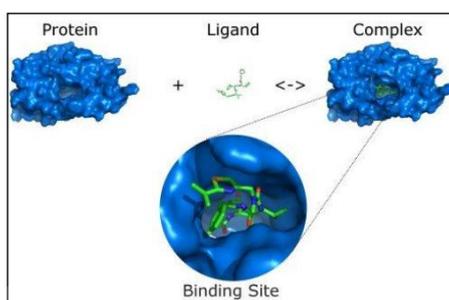
Metode GC biasanya digabungkan dengan metode identifikasi lainnya, yaitu spektrometer massa (MS) yang biasa disebut dengan GC-MS (Sastrohamidjojo, 1991; Gritter, 1991). Spektrometer massa adalah suatu teknik analisis yang digunakan untuk identifikasi suatu elemen yang belum diketahui dan untuk mengetahui struktur molekul (Van Bramer, 1998). Secara umum komponen instrumen MS meliputi ruang ionisasi, *mass analyzer*, dan detektor (JEOL, 2006). Metode ionisasi dalam MS dibedakan menjadi *electron impact* (EI) dan *chemical ionization* (CI) (Crawford Scientific, 2015). Pada identifikasi senyawa organik, molekul organik ditembak dengan berkas elektron menjadi ion bermuatan positif yang berenergi tinggi (ion molekuler), kemudian ion molekuler ini terpisah menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil. Fragmen-fragmen yang terpisah dicatat sebagai suatu puncak yang dinyatakan dalam satuan massa dibagi muatan (m/e). Spektrometer massa dapat mengidentifikasi massa molekul relatif (BM) dan pemenggalan suatu senyawa yang tidak diketahui, dengan membandingkannya terhadap senyawa yang dikenal (standar). Dari data yang diperoleh bila ada kesamaan dapat dianggap bahwa senyawa tersebut identik (Silverstein, 1981; Gritter, 1991). Output yang dihasilkan dari analisis ini adalah berupa spektrum yang ditunjukkan berdasarkan nilai massa fragmen (m/z). Semakin tinggi spektrum menunjukkan banyaknya fragmen yang terdeteksi.

G. MOLECULAR DOCKING

Molecular docking merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mempelajari interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul antara biomolekul

dengan molekul kecil atau ligan. Interaksi kompleks molekul tersebut bertujuan untuk mencapai suatu kestabilan. Tujuan dari molekular *docking* ini adalah pemodelan struktur dan memprediksi aktivitasnya secara akurat (Kitchen, 2004). *Docking* molekular sangat berguna dalam proses desain obat, seperti untuk memprediksi afinitas pengikatan dari inhibitor yang didesain terhadap enzim tertentu yang ingin dihambat aktivitasnya (Yeturu dan Chandra, 2008). Selain itu fungsi dari *docking* molekular adalah untuk meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi target aksinya pada uji secara *in vitro* (Motiejunas dan Wade, 2006). Protein target merupakan suatu makromolekul yang memiliki kemampuan dalam jalur metabolik atau berperan dalam suatu mekanisme aktivitas tertentu sehingga potensial sebagai target terapi. Terdapat dua aspek penting dalam *docking* molekular, yaitu fungsi skor nilai konformasi (*function scoring*) dan pencarian algoritma (*search algoritma*). Pencarian algoritma berfungsi untuk mengidentifikasi energi yang dihasilkan dari konformasi molekular dan kemudian mencari konformasi yang memiliki energi bebas paling rendah. Sedangkan fungsi *scoring* merupakan persyaratan interaksi secara termodinamik dari ikatan antara ligan dan protein untuk membedakan model mengikat dari semua konformasi dan diberikan peringkat yang sesuai (Sousa, *et al.*, 2006). AutoDockTools merupakan salah satu perangkat lunak untuk penambatan molekular ligan baik rigid maupun fleksibel yang menggunakan *grid-based force field* untuk mengevaluasi suatu kompleks. AutoDockTools merupakan salah satu aplikasi untuk *docking* molekular yang bersifat non komersial. Perangkat lunak ini merupakan salah satu aplikasi *docking* molekular

yang menggunakan model kinematik. Hal tersebut berjalan ketika proses penambatan/ *docking* dimana suatu ligan secara acak mulai proses pencarian untuk tempat ikatan dan mengeksplorasi untuk mendapatkan nilai translasi, rotasi, serta derajat kebebasan internal (*internal degrees of freedom*) sehingga akan menghasilkan konformasi terikat (Teodoro, *et al.*, 2001). Proses *docking* secara umum diperlihatkan pada gambar 4.



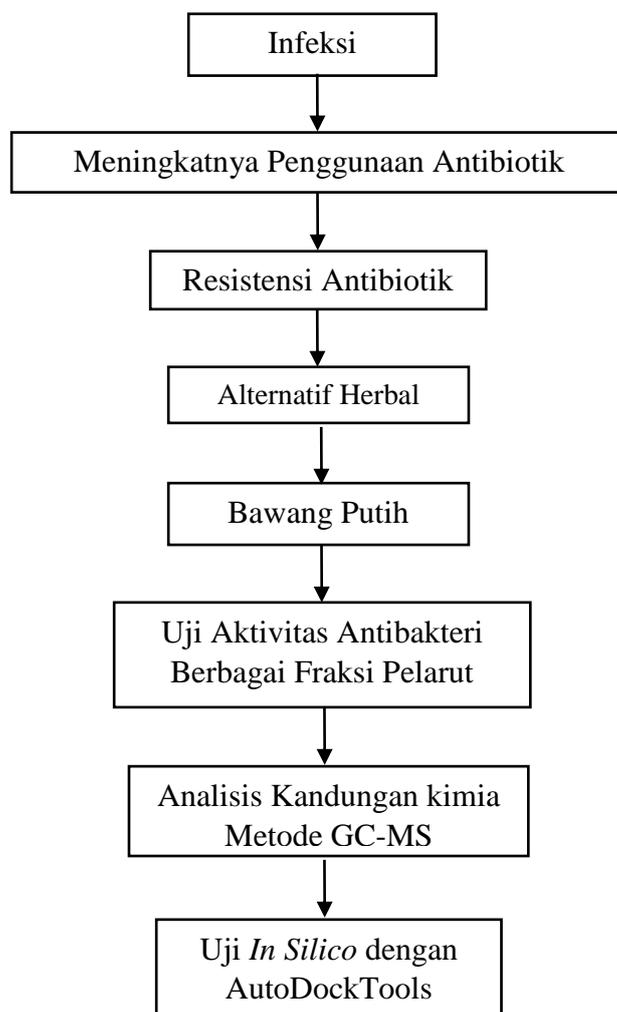
Gambar 4. *Docking* antara enzim dan ligan

Berdasarkan interaksi yang terjadi, terdapat beberapa jenis *docking* molekular, yaitu *docking* protein-protein, *docking* ligan-protein, *docking* ligan-DNA. Saat ini *docking* molekular banyak diaplikasikan di dalam desain obat untuk memprediksikan orientasi ikatan antara molekul obat dengan protein target sehingga dapat diketahui afinitas dari molekul obat tersebut. Untuk melakukan *docking*, hal pertama yang dibutuhkan adalah struktur tiga dimensi dari ligan dan protein target. Struktur tiga dimensi ligan dapat dimodelkan dengan menggunakan teknik pemodelan molekular sedangkan struktur tiga dimensi protein target dapat ditentukan secara empiris dengan menggunakan teknik spektroskopi NMR dan *X-ray crystallography* yang terdapat pada *database Protein Data Bank* dan secara *in silico* dengan teknik pemodelan homologi (Lucientes, 2004)

H. KERANGKA KONSEP

E. coli merupakan salah satu bakteri patogen penyebab infeksi. Penggunaan antibiotika yang berlebihan menyebabkan jumlah kuman patogen yang resisten meningkat salah satu diantaranya adalah *E. coli*. Untuk mengurangi hal tersebut, maka diperlukan suatu terapi komplementer atau terapi antibakteri lain untuk mengatasi kasus resistensi tersebut. Penggunaan bahan alam misalnya dengan menggunakan bawang putih dapat menjadi solusi untuk kasus resistensi (Eja, *et al.*, 2007).

Uji aktivitas antibakteri masing-masing fraksi ekstrak bawang putih terhadap bakteri *E. coli* diharapkan mendapatkan hasil sesuai yang diharapkan. Metode yang digunakan untuk penelitian ini adalah Kirby-Bauer. Bawang putih di ekstrak dengan etanol 70% dan hasil ekstrak etanol bawang putih tersebut di fraksinasi menggunakan pelarut etilasetat, metanol dan heksana. Gambar 5 berikut adalah skema kerangka konsep pada penelitian ini.



Gambar 5. Skema kerangka konsep

I. HIPOTESIS

1. Fraksi semipolar dan nonpolar memiliki aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *in vitro*.
2. Fraksi yang terbukti signifikan menghambat pertumbuhan *E. coli* memiliki kandungan senyawa organosulfur.

3. Berdasarkan analisis secara *molecular docking*, senyawa-senyawa organosulfur memiliki afinitas dalam menghambat protein DNA gyrase subunit B.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro* dan *in silico* untuk mengetahui daya uji antibakteri dari masing-masing fraksi ekstrak etanol bawang putih terhadap *E. coli*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2014 sampai Januari 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi UGM.

C. Identifikasi Variabel Penelitian

a) Uji Aktivitas Antibakteri

Variabel Bebas : Konsentrasi ekstrak etanol bawang putih pada variasi fraksi pelarut

Variabel Tergantung : Nilai DZI *E. coli* pada masing-masing fraksi pelarut dari ekstrak etanolik bawang putih

Variabel Terkendali : Media pertumbuhan bakteri

b) Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools

Variabel Bebas : Bentuk konformasi ikatan antara ligan dan protein target

Variabel Tergantung : *Docking score*
Variabel Terkendali : Perangkat keras, perangkat lunak, struktur ligan dan protein target

D. Definisi Operasional

1. Daya Antibakteri

Daya antibakteri adalah kemampuan suatu antibakteri membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Daya antibakteri dapat dilihat dari pertumbuhan *E. coli* pada media agar. Semakin besar daya antibakteri, maka semakin rendah kadar hambat minimal atau kadar bunuh minimal suatu antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri.

2. Diameter Zona Inhibisi

Zona inhibisi adalah luas daerah bening pada biakan medium bakteri setelah diinkubasi yang diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong (mm). Diameter zona *E. coli* adalah diameter zona bening yang muncul pada cakram kertas yang diukur dengan jangka sorong (dalam millimeter) untuk mengetahui kekuatan daya hambat fraksi ekstrak etanolik bawang putih terhadap pertumbuhan *E. coli*.

3. Kadar Hambat Minimum (KHM)

Kadar hambat minimum adalah konsentrasi terendah dari suatu antibakteri yang akan menghambat > 99,9% bakteri setelah diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35° C. Kadar hambat minimum ekstrak bawang putih terhadap *E. coli* dihitung berdasarkan konsentrasi terendah pada zona bening yang terlihat di sekitar cakram kertas.

4. *Docking Score*

Docking score merupakan nilai yang menggambarkan energi ikatan atau *binding energy* antara ligan dan protein target. Semakin kecil energi ikatan suatu konformasi, maka hasil *docking* semakin baik.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Peralatan gelas (Pyrex), tabung Erlenmeyer (Pyrex), cawan petri (Pyrex), *vortex* (Digisystem Laboratory Instrumen, Inc), timbangan analitik (Casbee), mikropipet (Gilson), kertas label, autoklaf (All American), inkubator (Memmert), *Laminar Air Flow* (LIEE), propipet (Glasfirm), aluminium foil, penangas (Akebonno), penggaris, seperangkat instrumen GC-MS (QP2010S SHIMADZU), *rotary evaporator* (Heidolph), seperangkat komputer (Acer G410), pipet volume, jarum ose, kapas, mesin giling simplisia, spatula, bunsen, pinset, kertas saring (Schleicher), lemari pendingin (Sanyo HF-S6L).

2. Bahan

Ekstrak bawang putih, bakteri *E. coli*, siprofloksasin infus (Novell Pharmaceutical Lab), aquadest steril (Brataco Chemika), *Brain Heart Infusion* (BHI), NaCl fisiologis (Otsuka), Mac Conkey, etanol 70% (Mandiri Surya/Grade Teknis), etilasetat (Merck), metanol (Merck), heksana (Merck), protein target (RCSB), struktur ligan (PubChem).

F. Cara Kerja

1. Penyiapan Bahan untuk Ekstraksi

Bahan berupa bawang putih dalam keadaan segar dikumpulkan dan dibersihkan dengan air. Bawang putih sebanyak 32 kg dirajang dan dikeringkan dengan cara dijemur selama 5-7 hari di bawah sinar matahari dan ditutupi kain hitam agar terhindar dari sinar matahari langsung. Simplisia kering digiling dan disaring sehingga diperoleh serbuk bawang putih.

2. Pembuatan Ekstrak Etanolik Bawang Putih

Serbuk bawang putih sebanyak 10 kg dari 32 kg bawang putih segar dimaserasi dengan menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:5 b/v selama 18 jam, kemudian disaring dengan menggunakan kain flanel. Pelarut etanol yang dibutuhkan untuk proses maserasi sebanyak 50 L. Semua maserat yang telah diperoleh kemudian dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan corong Buchner, sehingga diperoleh ekstrak kental bawang putih. Dihasilkan ekstrak kental bawang putih sebanyak 2,3 kg. Dari hasil ekstrak kental etanol yang dihasilkan kemudian di fraksinasi dengan pelarut etilasetat, metanol dan heksana.

3. Fraksinasi Ekstrak

Fraksinasi dilakukan berdasarkan sifat kepolarannya. Ekstrak kental etanol terlebih dahulu dibagi menjadi 3 bagian dalam Erlenmeyer dengan masing-masing 600 g. Ekstrak pekat sebanyak 600 gram dilarutkan dalam air panas sebanyak 200 ml lalu diaduk hingga encer dan homogen.

Masing-masing bagian ekstrak kental etanolik yang telah diencerkan kemudian dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer ukuran 2000 ml dan ditambahkan masing-masing pelarut dengan jumlah tertentu sehingga diperoleh perbandingan ekstrak kental etanolik bawang putih dan masing-masing pelarut sebesar 1:1 b:v. Ekstraksi cair-cair dilakukan didalam corong pisah.

Ekstraksi cair-cair dilakukan di dalam corong pisah. Erlenmeyer yang telah berisi ekstrak kental etanolik bawang putih dan suatu pelarut kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan dilakukan pengocokan. Campuran tersebut selanjutnya didiamkan selama 24 jam dan dilakukan pemisahan antara lapisan atas (fraksi pelarut) dan lapisan bawah (residu). Ekstraksi cair-cair dilakukan sebanyak 2 kali replikasi dengan menggunakan 300 ml pelarut untuk sekali pemisahan. Sari pertama dan kedua dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental untuk masing-masing pelarut. Dari hasil ekstraksi cair-cair didapatkan fraksi metanol sebanyak 219,7 g, fraksi etilasetat sebanyak 2,47 g dan fraksi heksana sebanyak 2,33 g.

4. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan untuk pemeriksaan mikrobiologi harus disterilkan terlebih dahulu sebelum dipakai. Alat-alat gelas yang digunakan disterilkan menggunakan oven pada suhu 170° C selama 1-2 jam dan jarum ose disterilkan dengan cara flambir pada nyala bunsen. Bahan-bahan seperti media Mac Conkey disterilkan dengan autoklaf pada suhu

121°C selama 15 menit dan aquadest disterilkan dengan penangas hingga mendidih selama 15 menit. Pengerjaan uji mikrobiologi dilakukan secara aseptis di dalam lemari aseptis yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70%, lalu disinari dengan lampu UV yang dinyalakan 15 menit sebelum digunakan.

5. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin. Siprofloksasin yang digunakan untuk pengujian sebanyak 5 µg sehingga diperlukan konsentrasi 5 µg/10 µl untuk 1 cakram kertas. Untuk menghasilkan larutan uji tersebut, maka sebanyak 1 ml sediaan infus siprofloksasin 2 mg/ml dimasukkan ke dalam gelas ukur kemudian ditambahkan aquadest hingga volume 4 ml.

6. Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan ada 2 macam, yaitu aquadest dan campuran aquadest dan span 80. Campuran aquadest dan span 80 dibuat dengan menambahkan 0,5 ml span 80 dengan aquadest hingga volume 10 ml.

7. Pembuatan Media Pertumbuhan

a. Media Mac Conkey, cara pembuatannya sebagai berikut:

Memasukkan 20 g serbuk agar Mac Conkey ke dalam labu Erlenmeyer kemudian dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 385 ml sampai homogen dan disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu

121° C selama 15 menit. Larutan Mac Conkey yang telah disterilisasi dimasukkan ke dalam cawan petri dengan ketebalan media ± 5 ml di dalam LAF, kemudian didiamkan sampai membeku dan disimpan dalam posisi terbalik untuk menghindari penguapan air dalam media cawan petri. Membiarkan media tersebut selama 24 jam pada suhu kamar sebelum digunakan untuk uji kultur bakteri.

b. *Brain Heart Infusion* (Merck)

Ditimbang 37 gram BHI dan dilarutkan dengan 1 L aquadest dan dipanaskan hingga semuanya larut lalu disterilkan dalam autoklaf.

8. Pembuatan Larutan Uji

Pada pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode Kirby-Bauer, larutan uji dibuat dengan melarutkan ekstrak etanol bawang putih menggunakan etanol 70%. Ekstrak etanol yang dihasilkan dilakukan fraksinasi dengan pelarut yang berbeda yaitu etilasetat, heksana dan metanol. Fraksi metanol diencerkan dengan aquadest steril, sedangkan fraksi etilasetat dan heksana diencerkan dengan ditambahkan 0,1 ml span 80 untuk melarutkan dan ditambahkan aquadest. Masing-masing fraksi ekstrak kental bawang putih dibuat larutan induk dengan konsentrasi 100% dengan cara melarutkan 2 g masing-masing fraksi dengan aquadest hingga volume 2 ml. Larutan uji dibuat variasi konsentrasi yaitu antara lain 1%, 5%, 10%, 25%, 50% dan 75% v/v dengan cara melarutkan 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, dan 0,75 ml masing-masing fraksi larutan induk dengan aquadest hingga volume 1 ml.

9. Pembuatan Stok Bakteri

Bakteri uji diinokulasi pada medium Mac Conkey dengan cara menggoreskan bakteri menggunakan jarum ose pada permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

10. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam, diambil beberapa ose kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% fisiologis steril sebanyak 1 ml. Biakan bakteri didiamkan selama 2-3 jam, lalu tambahkan BHI sebanyak 9 ml dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*.

11. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Suspensi *E. coli* dibuat dengan NaCl steril. Kemudian di siapkan 63 buah cakram kertas untuk masing-masing larutan uji ke dalam cawan petri, 54 cakram kertas untuk masing-masing konsentrasi bahan uji 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% yang di replikasi sebanyak 3 kali, masing-masing 3 cakram kertas untuk aquadest steril, aquadest steril campur span 80 sebagai kontrol negatif dan siprofloksasin 10 µl sebagai kontrol positif. Untuk uji aktivitas antibakteri dibutuhkan 16 buah cawan petri yang berisi media Mac Conkey. Selanjutnya dengan menggunakan *swab* steril, suspensi *E. coli* disebar pada permukaan medium Mac Conkey sampai permukaannya tertutupi. Cakram kertas yang telah mengandung bahan uji diletakkan diatas permukaan Mac Conkey yang telah diberi suspensi *E. coli* dan diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Pengujian ini dilakukan 3 kali replikasi untuk menjaga reliabilitas.

Diameter hambatan pada masing-masing ekstrak terfraksi dengan variasi konsentrasi tersebut dibandingkan dengan diameter hambatan yang terbentuk pada kontrol positif dan negatif.

12. Pengamatan Zona Inhibisi

Daya hambat diketahui berdasarkan pengukuran diameter zona inhibisi (zona bening) yang terbentuk di sekitar cakram kertas. Pengukuran tersebut menggunakan jangka sorong atau penggaris. Daya hambat minimal diketahui dari konsentrasi terkecil yang sudah dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* secara nyata.

13. Analisis GCMS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

Dalam penelitian ini digunakan analisa GC-MS untuk menganalisa dan mengidentifikasi senyawa organosulfur yang terdapat dalam fraksi bawang putih yang telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. GC-MS yang digunakan adalah QP2010S SHIMADZU. Untuk menganalisa hasil ekstraksi bawang putih sampel dimasukkan kedalam kolom nonpolar AGILENTJ%W DB-1 dengan panjang 30 meter serta memiliki ketebalan internal 0,25 mm. Fase gerak yang digunakan adalah gas helium dengan kecepatan 0,54 ml menit. Sistem pemanasan diatur dari suhu 50 hingga 260°C dengan peningkatan sebesar 5°C setiap menit. Dalam instrumen MS digunakan energi ionisasi sebesar 70 eV dengan metode *electron impact* (EI). Sampel uji mula-mula dilarutkan dengan pelarut yang sesuai (metanol/etilasetat/heksana) secukupnya hingga diperoleh konsentrasi 1%. Sampel yang diinjeksikan sebanyak 1 µl ke

dalam instrumen GC dan hasilnya diamati melalui spektrum yang diinterpretasikan berdasarkan berat molekul dan waktu retensi senyawa organosulfur yang dituju.

14. Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools

a. Preparasi Protein Target

Protein target yang digunakan dalam uji *in silico* adalah DNA gyrase subunit B dengan nama *crystal structure of a topoisomerase ATPase inhibitor*. Data protein diperoleh dari RSCB (<http://www.rscb.org>) dengan PDB ID 3TTZ. *File* protein target tersebut diunduh dengan format PDB *file*. Berkas tersebut dibuka dengan menggunakan aplikasi *Discovery Studio Visualizer* dan dilakukan preparasi dengan menghilangkan komponen pengganggu. Hasil tersebut kemudian disimpan dalam format PDB (*.pdb).

b. Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa-senyawa organosulfur yang diperoleh melalui analisis GC-MS dari fraksi etilasetat dan heksana. Data ligan diunduh melalui PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dan dipilih dalam bentuk 3D SDF dan di simpan dalam format PDB (*.pdb).

c. Preparasi Ligan dan Protein Target Dalam Format PDBQT

Hasil preparasi protein dilakukan lebih lanjut dengan aplikasi AutoDockTools dengan menambahkan atom hidrogen polar yang berfungsi untuk memberikan muatan parsial dalam protein target

tersebut. Target protein ditambahkan muatan melalui pilihan *Kollman Charges* dan disimpan dalam format *.pdbqt. Input ligan melalui perintah *Open Ligand* pada aplikasi AutoDockTools. Ligan yang sudah diinput kedalam AutoDockTools diubah formatnya dari *.pdbqt menjadi *.pdb. Setelah format diubah maka dilakukan preparasi dalam *Torsion Tree* dan *Aromatic Carbons* dan disimpan dalam format *.pdbqt.

d. Preparasi *Grid Parameter File*

Aplikasi AutoDockTools yang masih terbuka kemudian dipilih bagian *Grid* dan dipilih ligan melalui fungsi *Set Map Types* dan dilanjutkan dengan memilih ligan serta preparasi *Grid Box* yang merupakan penentuan area untuk simulasi *docking*. Hasil *grid parameter file* disimpan dalam format (*.gpf).

e. Preparasi *Docking Parameter File*

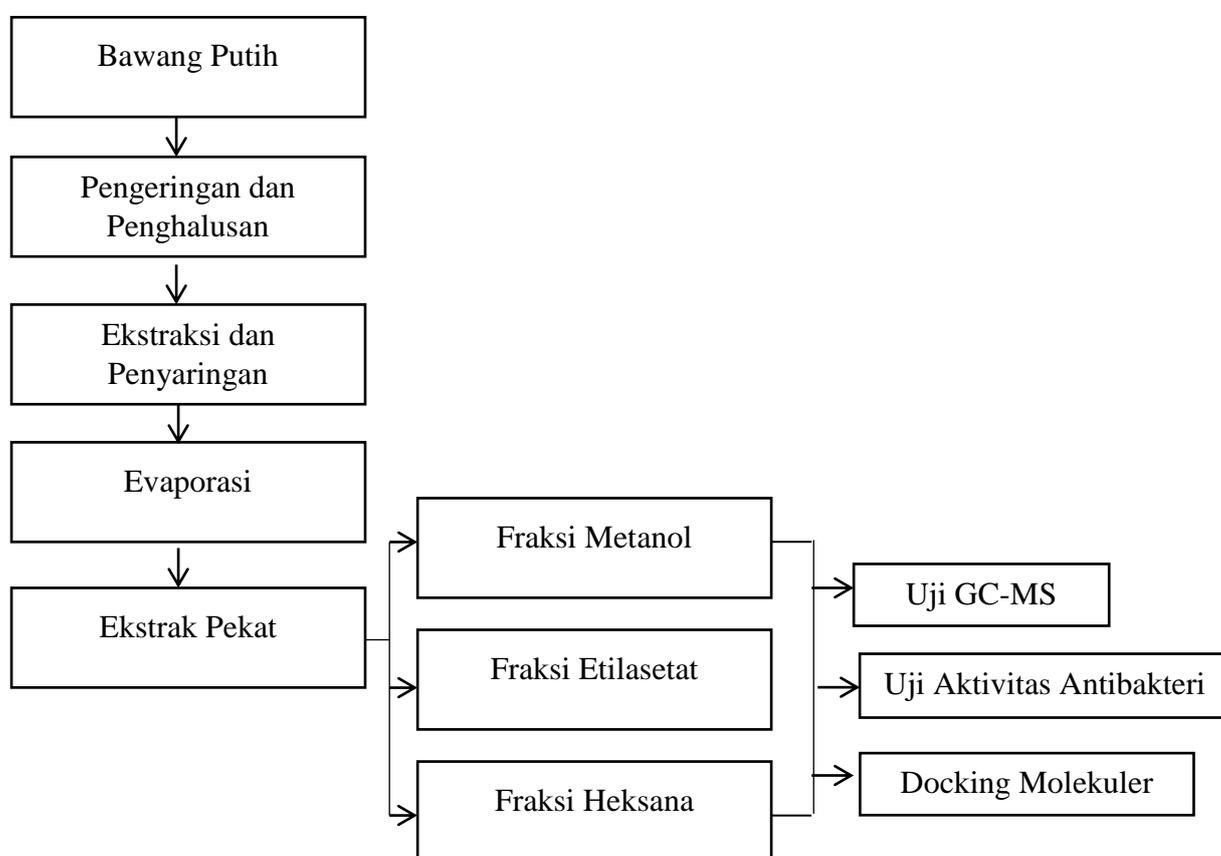
Aplikasi AutoDockTools yang masih terbuka lalu dipilih bagian *Macromolecules* dan dipilih *Set Rigid Filename*. Proses *docking* dapat dilakukan pengaturan melalui perintah *Search Parameters* dan *Docking Parameters*. Selanjutnya dipilih bagian *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) dan disimpan dalam format *.dpf.

f. Simulasi *Docking*

Docking dilakukan dengan menggunakan AutoGrid 4.2 dan AutoDock 4.2 melalui Cygwin terminal. *File* yang harus disiapkan untuk melakukan *docking* adalah *file* enzim dalam format *.pdbqt,

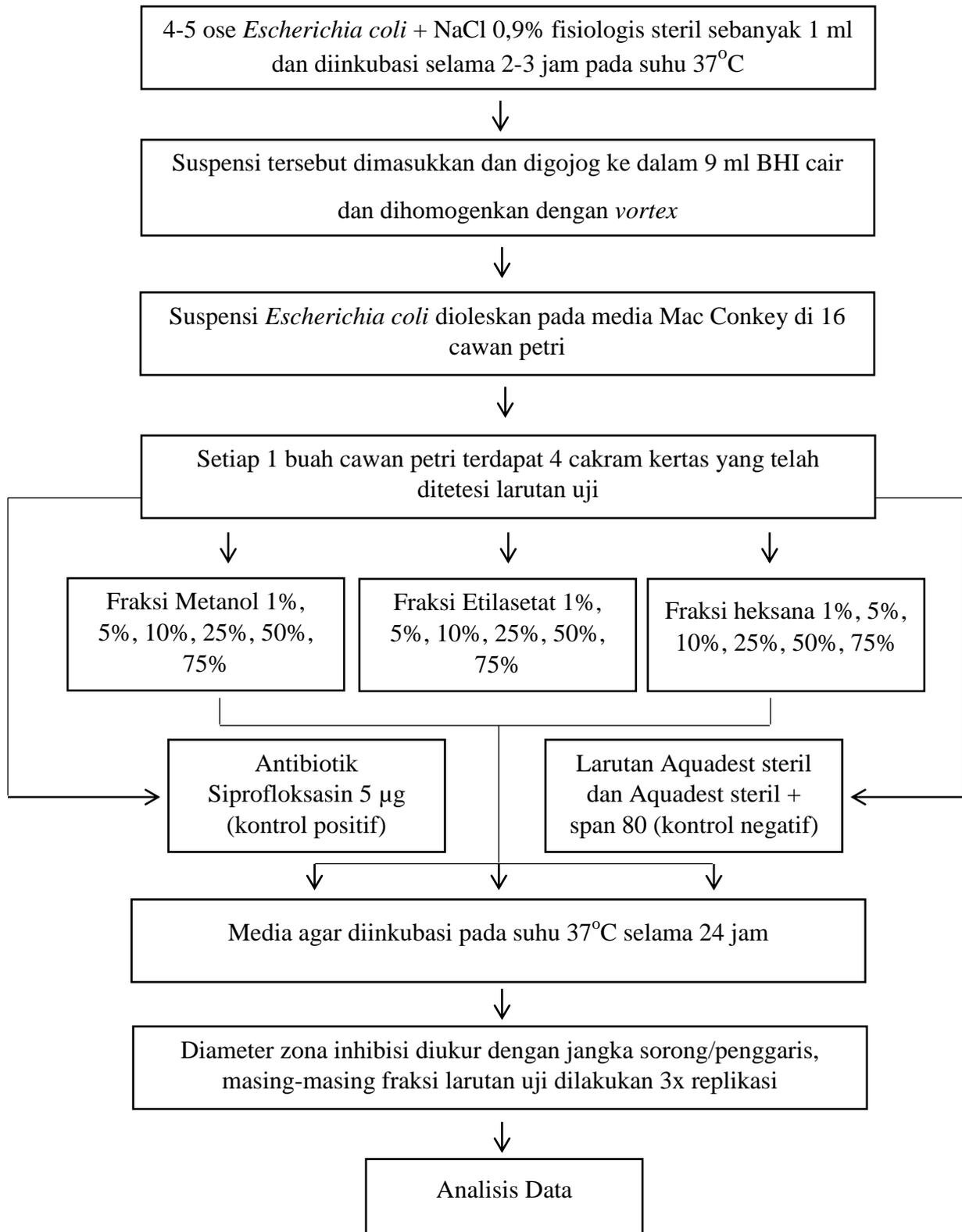
ligan dalam format *.pdbqt, *grid parameter file* (*.gpf) dan *docking parameter file* (*.dpf). Algoritma yang digunakan adalah *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA). Hasil simulasi *docking* ini berupa *file* dengan format *.dlg yang berisi informasi 10 konformasi dan *file* complex.pdb untuk kebutuhan visualisasi hasil.

15. Alur Penelitian



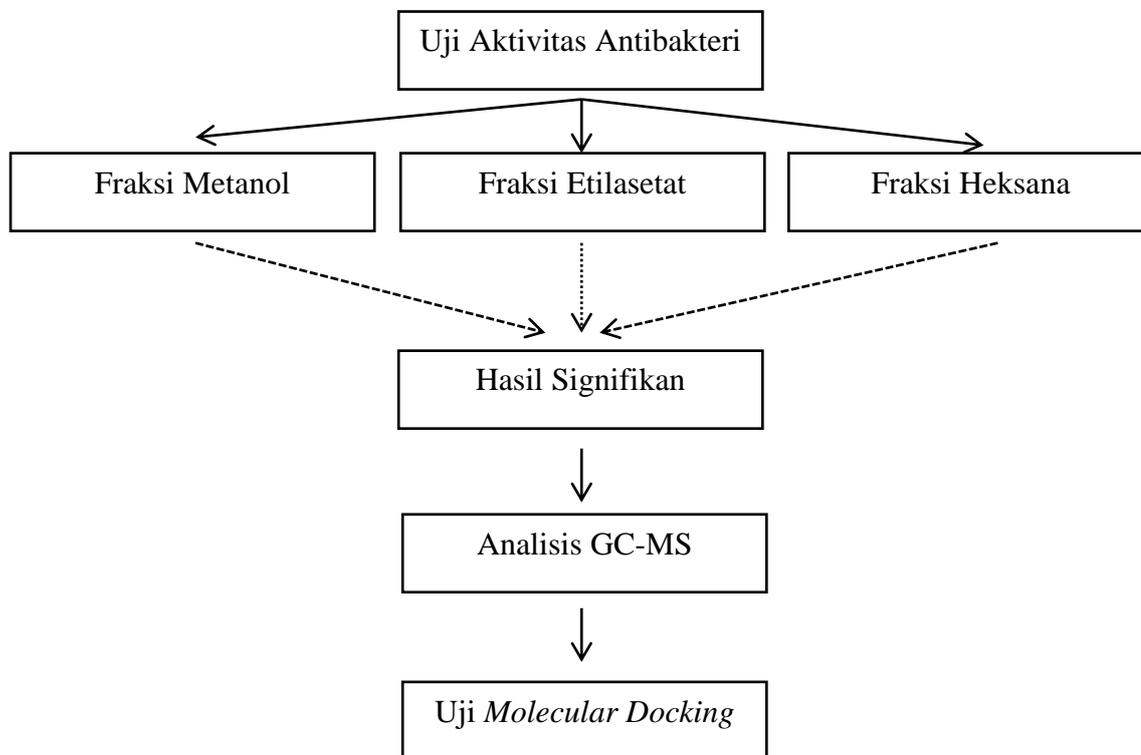
Gambar 6. Alur Penelitian

1. Uji Aktivitas Antibakteri



Gambar 7. Skema Langkah Kerja Uji Aktivitas Antibakteri

2. Analisis GC-MS dan Uji *In Silico*



Gambar 8. Skema Langkah Kerja Secara Umum

G. Analisis Hasil Penelitian

Analisis hasil penelitian berupa analisis deskriptif dan bersifat kuantitatif dengan cara mengukur zona inhibisi pada masing-masing fraksi ekstrak bawang putih dan siprofloksasin serta dilakukan uji kualitatif dengan melakukan uji GC-MS.

Data hasil pengujian pada masing-masing fraksi ekstrak bawang putih terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dianalisa secara statistik menggunakan metode *One Way* ANOVA (analisa varians satu arah). Bertujuan untuk menguji ada tidaknya perbedaan nilai rata-rata secara signifikan variabel terikat pada dua atau lebih kelompok secara bersamaan. Dimana terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata tiap kelompok jika probabilitas $< 0,05$ dan jika probabilitas $> 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata tiap kelompok (Walpole, 1993). Selanjutnya untuk membandingkan rata-rata setiap perlakuan, maka dilanjutkan dengan analisis *Tukey* HSD menggunakan program *Statistical Product Services Solution* (SPSS 16).

Analisis kandungan senyawa golongan organosulfur dari fraksi bawang putih yang terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dilakukan dengan cara melihat spektrum hasil pemisahan pada instrumen GC yang berupa *peak* atau puncak berdasarkan nilai waktu retensi. Hasil interpretasi berdasarkan nilai m/z senyawa organosulfur yang dituju seperti *allicin*, dialil sulfida, dialil disulfida, *2-vinyl-{4H}-1,3-dithiin*, dll.

Hasil uji *molecular docking* menggunakan AutoDock 4.2 diperoleh *data file* dengan format *.dlg dan *file complex.pdb*. *File* dengan format *.dlg dibuka melalui aplikasi AutoDockTools dan berisi 10 konformasi ikatan antara ligan dengan protein target. Dari hasil tersebut kemudian dipilih 1 konformasi yang memiliki energi ikatan paling rendah untuk dianalisa interaksinya. Analisis dilakukan dengan membandingkan energi ikatan (*binding energy*) dari konformasi terbaik masing-masing senyawa organosulfur dengan siprofloksasin dan *ref ligand*/ ligan referensi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan uji yang dipergunakan dalam penelitian ini. Identifikasi tanaman bahan uji dilakukan di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan sebagai bahan uji adalah bawang putih (*Allium sativum* L.) dari suku *Liliaceae* (lampiran 1).

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% untuk ekstrak kasar dan pelarut metanol, etilasetat, heksana untuk fraksinasi ekstrak. Pengambilan bahan aktif diambil dari umbi bawang putih, ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan cara sampel dikeringkan dan diserbuk kemudian dilarutkan dalam etanol 70%. Dari 32 kg bawang putih didapatkan serbuk kering sebesar 10 kg dan ekstrak serbuk yang didapatkan dihasilkan ekstrak kental sebesar 2,3 kg.

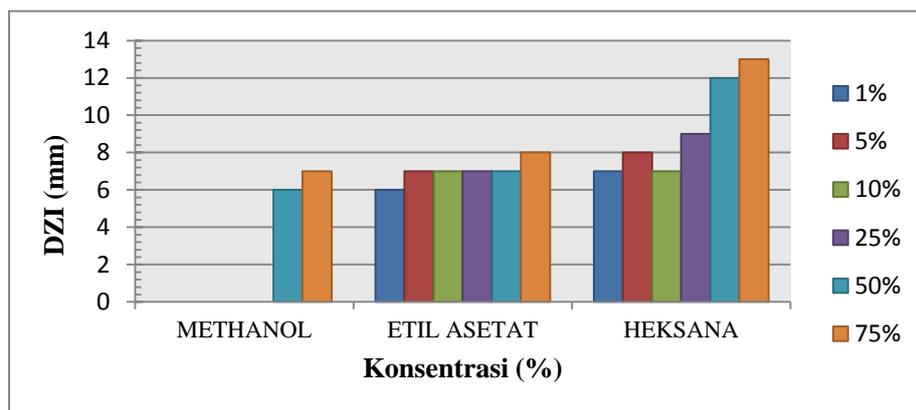
Untuk mendapatkan senyawa yang terpurifikasi maka dilakukan fraksinasi dari ekstrak kental yang didapat. Metode yang digunakan adalah ekstraksi cair-cair atau corong pisah. Ekstraksi cair-cair adalah metode

pemisahan dengan menggunakan dua cairan pelarut yang tidak saling bercampur, sehingga senyawa tertentu terpisahkan menurut kesesuaian sifat dengan cairan pelarut (*solve dissolve like*). Hasil yang didapat adalah fraksi heksana sebesar 2,33 g berwarna coklat kekuningan, fraksi etilasetat 2,47 g berwarna coklat dan fraksi metanol 219,7 g berwarna coklat tua.

3. Uji Aktivitas Antibakteri

Dalam penelitian ini untuk mengetahui adanya aktivitas daya antibakteri dari bawang putih terhadap bakteri *E. coli* menggunakan metode *disk* difusi (Kirby-Bauer). *Disk* difusi atau difusi cakram merupakan salah satu tes yang dapat digunakan untuk menentukan profil resistensi suatu antimikroba dari suatu organisme. Prinsip dari metode ini sederhana, yaitu cawan petri yang berisi agar Mac Conkey diinokulasi dengan bakteri yang diuji yaitu *E. coli*. Cakram kertas yang digunakan untuk pengujian metode ini mengandung sejumlah agen antimikroba yang dapat berdifusi ke dalam media agar ketika kontak dengan permukaan media. Selama inkubasi agen antimikroba berdifusi ke media agar dan menghambat pertumbuhan bakteri, menghasilkan zona hambat di sekitar cakram kertas.

Hasil diameter zona hambat pada masing-masing fraksi terhadap *E. coli* pada konsentrasi 1%, 5%, 10%, 25%, 50% dan 75% didapatkan besar zona hambat berbeda-beda (gambar 9). Dari hasil uji diketahui semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin tinggi daya hambatnya. Nilai DZI pada masing-masing fraksi dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Diagram perbandingan rata-rata DZI pada masing-masing fraksi

Dari diagram diatas dapat dilihat nilai DZI pada konsentrasi yang berbeda di tiap fraksi ekstrak bawang putih. Data menunjukkan bahwa nilai DZI terbesar terdapat pada fraksi heksana dengan nilai sebesar 13 mm. Sedangkan pada fraksi metanol pada konsentrasi 1% sampai 25% tidak menunjukkan adanya daya antibakteri pada media. Fraksi etilasetat menunjukkan ada daya antibakteri karena pada setiap konsentrasi memiliki nilai DZI.

Berdasarkan hasil penelitian zona hambat pada sekitar cakram kertas yang telah direndam di dalam masing-masing fraksi bawang putih terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dari yang terbesar sampai yang terkecil adalah fraksi heksana, fraksi etilasetat dan fraksi metanol. Pada fraksi polar dengan metanol hasil menunjukkan tidak ada zona hambat yang terbentuk pada rentang konsentrasi 1% sampai 25%. Pada konsentrasi 50% sampai 75% ada aktivitas antibakteri yang terbentuk dengan nilai DZI masing-masing 6 mm dan 7 mm. Hal ini menunjukkan bahwa pada fraksi metanol dibutuhkan konsentrasi lebih tinggi untuk membuat ekstrak memiliki daya hambat yang lebih besar. Dari penelitian yang telah dilakukan dengan metode GC-MS pada fraksi etilasetat dan heksana terdapat senyawa sulfur berupa *allicin*, dialil disulfida, dialil trisulfida, dll. Sedangkan

pada fraksi metanol tidak dilakukan identifikasi senyawa karena tidak menunjukkan hasil yang signifikan pada daya hambat yang terbentuk. Pada fraksi metanol nilai DZI muncul pada konsentrasi yang tinggi dengan nilai zona hambat rendah yaitu hanya 6 mm dan 7 mm, kemungkinan komponen sulfur yang terdapat dalam bawang putih tidak ikut terlarut pada fraksi metanol. Dari hal ini didapatkan nilai KHM fraksi metanol berada pada konsentrasi 50%. Tabel 1 berikut adalah nilai DZI pada fraksi metanol yang di replikasi.

Tabel 1. Nilai DZI fraksi metanol terhadap pertumbuhan *E. coli*

Perlakuan	Diameter Zona Inhibisi (mm)					
	Konsentrasi					
	1%	5%	10%	25%	50%	75%
Replikasi 1	0	0	0	0	6	7
Replikasi 2	0	0	0	0	6	7
Replikasi 3	0	0	0	0	6	7
Rata-rata	0	0	0	0	6 ± 0	7 ± 0

Fraksi semipolar dengan menggunakan pelarut semi polar yaitu etilasetat menunjukkan zona hambat pada semua konsentrasi mulai dari konsentrasi 1% sampai 75%. Zona hambat terbesar pada fraksi etilasetat ditunjukkan pada cawan petri dengan konsentrasi 75% dengan rata-rata 8 mm. Sedangkan daya hambat terkecil terdapat pada cawan petri dengan konsentrasi 1% dengan rata-rata 6 mm. Dari hal ini didapatkan nilai KHM fraksi etilasetat berada pada konsentrasi 1% yang dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai DZI fraksi etilasetat terhadap pertumbuhan *E. coli*

Perlakuan	Diameter Zona Inhibisi (mm)					
	Konsentrasi					
	1%	5%	10%	25%	50%	75%
Replikasi 1	6	7	7	7	7	9
Replikasi 2	6	7	7	7	9	9
Replikasi 3	6	7	7	7	9	9
Rata-rata	6 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	8,33 ± 1,154	9 ± 0

Fraksi nonpolar menggunakan pelarut heksana menunjukkan zona hambat terbesar terbentuk pada cawan petri dengan konsentrasi 75% dengan rata-rata 13 mm, sedangkan daya hambat terkecil terdapat pada fraksi heksana dengan konsentrasi 1% dengan rata-rata 7 mm. Hal ini menunjukkan pada fraksi heksana semua konsentrasi efektif menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Nilai KHM untuk fraksi heksana berada pada konsentrasi 1% yang dapat dilihat pada tabel 3. Dari hasil ini diketahui fraksi heksana lebih poten dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* apabila dibandingkan dengan fraksi metanol dan etilasetat.

Tabel 3. Nilai DZI fraksi heksana terhadap pertumbuhan *E. coli*

Perlakuan	Diameter Zona Inhibisi (mm)					
	Konsentrasi					
	1%	5%	10%	25%	50%	75%
Replikasi 1	7	8	9	9	9	13
Replikasi 2	7	8	9	9	9	13
Replikasi 3	7	8	9	9	12	13
Rata-rata	7 ± 0	8 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	10 ± 1,732	13 ± 0

Hasil pengujian tersebut dilakukan perbandingan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin 5 μg , dan kontrol negatif yang digunakan adalah aquadest steril dan campuran aquadest dan span 80. Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk menjaga reliabilitas dan dinyatakan dalam tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antibakteri kontrol positif (siprofloksasin 5 μg) dan kontrol negatif (aquadest steril dan aquadest steril + span 80) terhadap inhibisi pertumbuhan *E. coli*

Jenis	DZI (mm)		
	Siprofloksasin 5 μg	Aquadest steril	Aquadest steril + span 80
Replikasi 1	30	0	0
Replikasi 2	30	0	0
Replikasi 3	30	0	0
Rata-rata	30	0	0

Berdasarkan pengamatan uji aktivitas antibakteri dari masing-masing fraksi ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif diketahui bahwa perlakuan masing-masing fraksi ekstrak memiliki efek yang sama dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* sama dengan siprofloksasin. Sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan adanya zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Siprofloksasin adalah antibiotik spektrum luas atau memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif yang pada penelitian ini menggunakan bakteri *E. coli*. Nilai zona hambat yang terbentuk pada 3 x replikasi adalah sebesar 30 mm. Menurut *Performance Standards for Antimicrobial* (2012) mengatakan bahwa antibiotik siprofloksasin dikatakan sensitif apabila memiliki

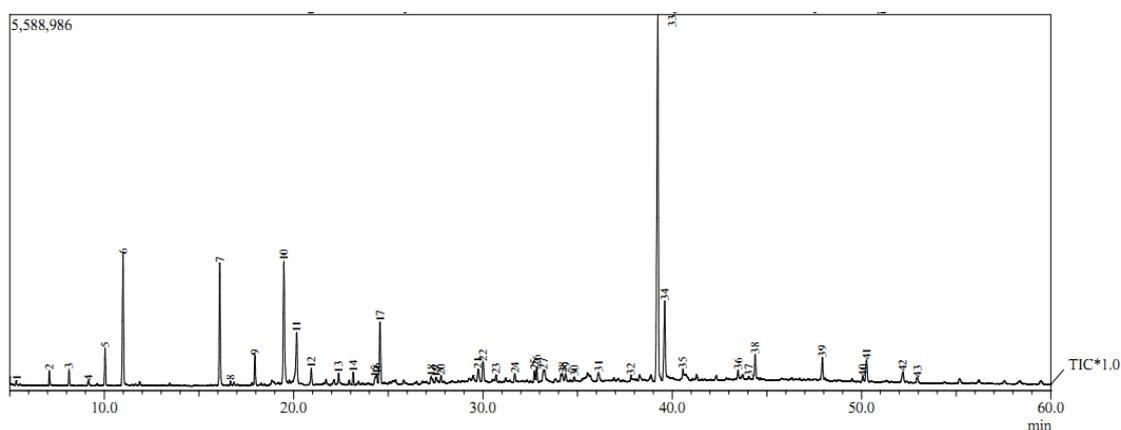
DZI > 21 mm, sedang 16-20 mm dan resisten < 15 mm. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa siprofloksasin dalam kategori sensitif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* karena zona hambat yang terbentuk adalah 30 mm. Diameter zona hambat pada semua fraksi bawang putih memiliki nilai lebih rendah dibanding siprofloksasin (5 µg).

Untuk melihat perbedaan antara ketiga fraksi yang diujikan terhadap bakteri *E. coli* menggunakan metode uji *One-Way ANOVA*. Uji *One-Way ANOVA* digunakan untuk menguji apakah dari semua sampel mempunyai rata-rata yang sama. Berdasarkan hasil uji deskriptif diketahui bahwa rata-rata nilai DZI dari yang terkecil hingga yang terbesar berturut-turut adalah fraksi metanol, fraksi etilasetat, dan fraksi heksana (lampiran 2). Untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dan mana yang tidak berbeda secara signifikan dilakukan analisis lanjutan *Tukey HSD*. Dari hasil analisis data menggunakan metode *Tukey* didapatkan perbedaan rata-rata diantara semua sampel benar-benar nyata. Hasil uji *Tukey* tersebut menunjukkan bahwa fraksi heksana dan etilasetat lebih signifikan dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* daripada fraksi metanol. Dari hasil pengujian dapat disimpulkan bahwa fraksi heksana dan etilasetat memiliki kemampuan yang hampir sama dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan lebih signifikan daripada fraksi metanol.

4. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Analisis kandungan kimia metode GC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa organosulfur yang terdapat pada fraksi etilasetat dan heksana yang terbukti signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Komponen

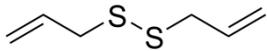
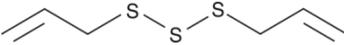
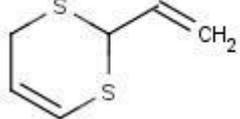
senyawa fraksi heksan dan etilasetat dianalisis menggunakan GC-MS kolom ke dalam kolom AGILENTJ%W DB-1 dengan panjang kolom 30 m dan diameter internal 0,25 mm. Fase gerak yang digunakan adalah gas Helium dengan kecepatan alir 0,54 ml/menit. Gambar 10 dan 11 adalah kromatogram hasil GC MS dari masing-masing fraksi. Hasil pengujian dinyatakan dalam tabel 5 & 6.

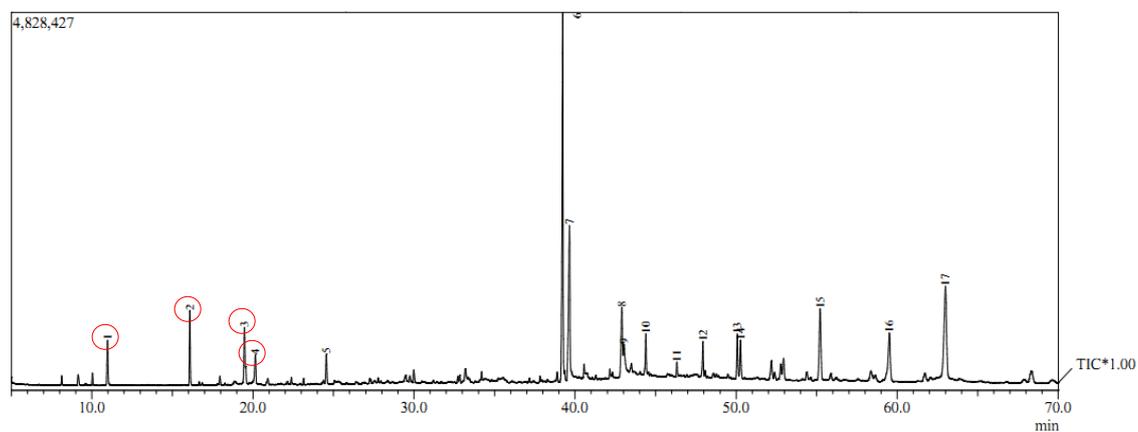


Gambar 10. Kromatogram Fraksi Etilasetat

Tabel 5. Senyawa organosulfur fraksi etilasetat

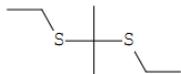
No. <i>Peak</i>	Rt (menit)	BM	Senyawa	Struktur Kimia
3	8,133	114	Dialil monosulfida	
5	10,033	120	Metil alil disulfida	
6	10,992	164	<i>Diethyl mercaptole</i>	
		103	Dietilthioasetamida	

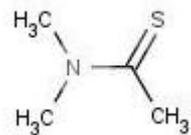
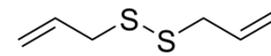
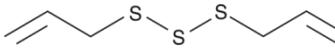
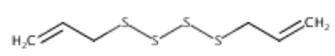
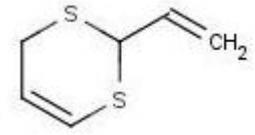
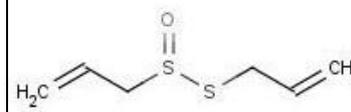
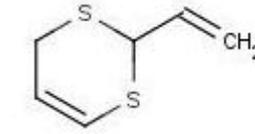
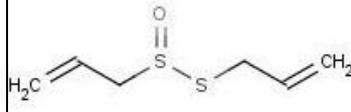
7	16,100	146	Dialil disulfida	
		178	Dialil trisulfida	
8	16,658	210	Dialil tetrasulfida	
9	17,958	88	(E)-(CAS) Trans metil propenil sulfida	
11	20,158	144	2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin	



Gambar 11. Kromatogram Fraksi Heksana

Tabel 6. Senyawa Organosulfur fraksi heksana

No. Peak	Rt (menit)	BM	Nama Senyawa	Struktur Kimia
1	10,975	164	Diethyl mercaptole	

		103	Dimetilthioasetamida	
2	16,083	146	Dialil disulfida	
		178	Dialil trisulfida	
		210	Dialil tetrasulfida	
3	19,467	144	<i>2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin</i>	
		162	<i>Allicin</i>	
4	20,150	144	<i>2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin</i>	
		162	<i>Allicin</i>	

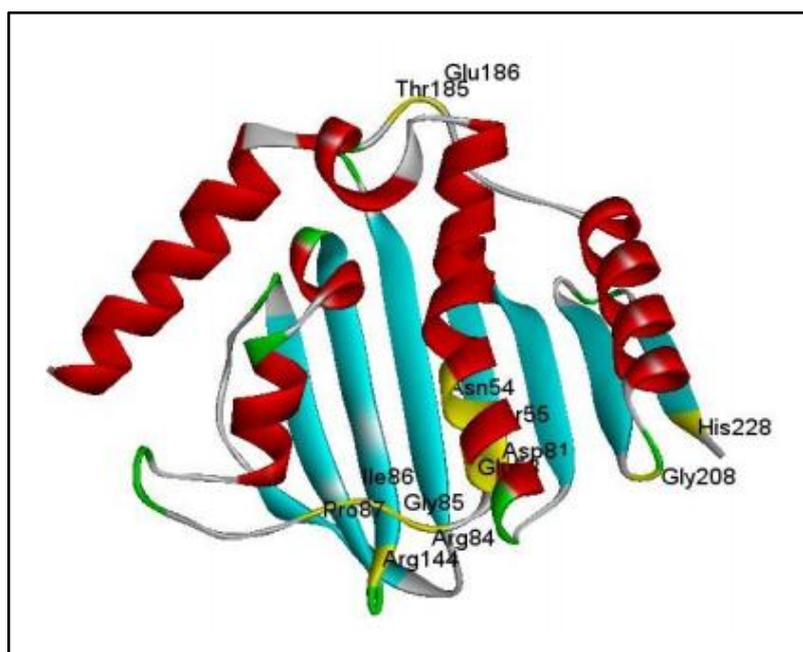
Berdasarkan hasil analisis GC-MS fraksi etilasetat dan heksan mengandung senyawa organosulfur seperti dialil sulfida dan *allicin* yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dari bawang putih. Selain *allicin* juga terdapat senyawa 2-

vinyl-[4H]-1,3-dithiin yang mempunyai efek menghambat agregasi trombosit, siklooksigenase sehingga berperan dalam regulasi tekanan darah (Nikolic, 2003).

5. Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools

a. Model Struktur DNA gyrase subunit B

Protein target yang digunakan adalah DNA gyrase subunit B yang diperoleh dari *Database Protein Bank* (PDB) pada situs <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Hasil visualisasi ditunjukkan dalam gambar 12.



Gambar 12. Visualisasi sisi aktif DNA gyrase subunit B

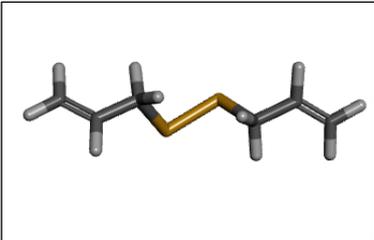
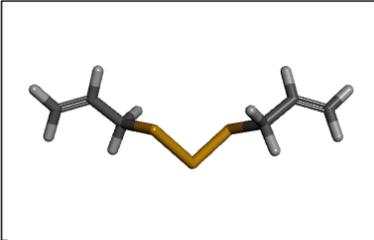
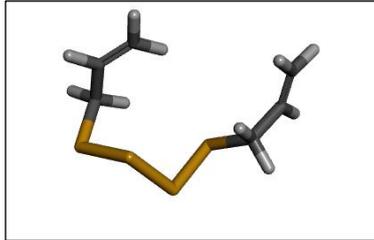
Dari hasil visualisasi diatas dapat dilihat terdapat sisi aktif dari DNA gyrase subunit B yang ditunjukkan dengan area berwarna kuning. Sisi aktif protein target tersebut terletak pada arginin 144 (Arg144), arginin 84 (Arg84), glicin 208 (Gly208), isoleusin 86 (Ile86), prolin87 (Pro87), threonin 185

(Thr185), asam glutamat 186 (Glu186), asparagin 54 (Asn54), serin 55 (Ser55), histidin 228 (His228), asam glutamat 58 (Glu58) dan asam aspartat 81 (Asp81).

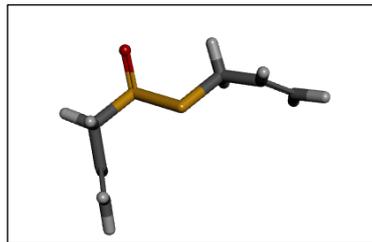
b. Visualisasi Ligan

Senyawa-senyawa organosulfur yang terdeteksi dalam identifikasi GC-MS pada tabel 1 dan 2 digunakan sebagai ligan dalam uji *molecular docking*. Selain senyawa organosulfur juga digunakan ligan dari siprofloksasin dan 2-[(3*S*,4*R*)-4-[[3,4-dichloro-5-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)carbonyl]amino}-3-fluoropiperidin-1-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylic acid (ref ligan). Visualisasi masing-masing ligan ditunjukkan dalam tabel 7 berikut :

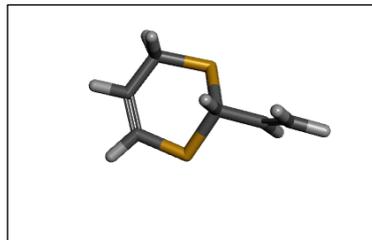
Tabel 7. Visualisasi Ligan

No	Ligan	Struktur 3D
1.	Dialil disulfida	
2.	Dialil trisulfida	
3.	Dialil tetrasulfida	

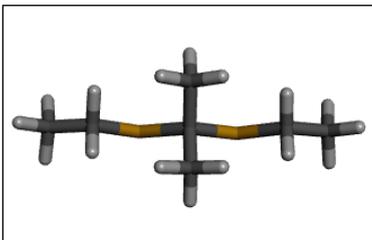
4. *Allicin*



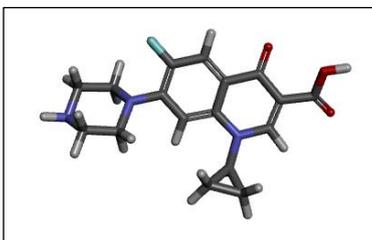
5. *2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin*



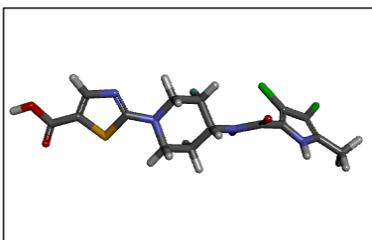
6. *Diethyl mercaptole*



7. *Siprofloksasin*



8. *Ref ligan*



c. Interaksi Ligan terhadap Protein Target

Interaksi ligan terhadap protein akan menghasilkan 10 konformasi yang berisi informasi energi dari masing-masing konformasi. Energi ikatan dan konstanta inhibitor harus diperhatikan dalam analisa hasil *docking*. Nilai

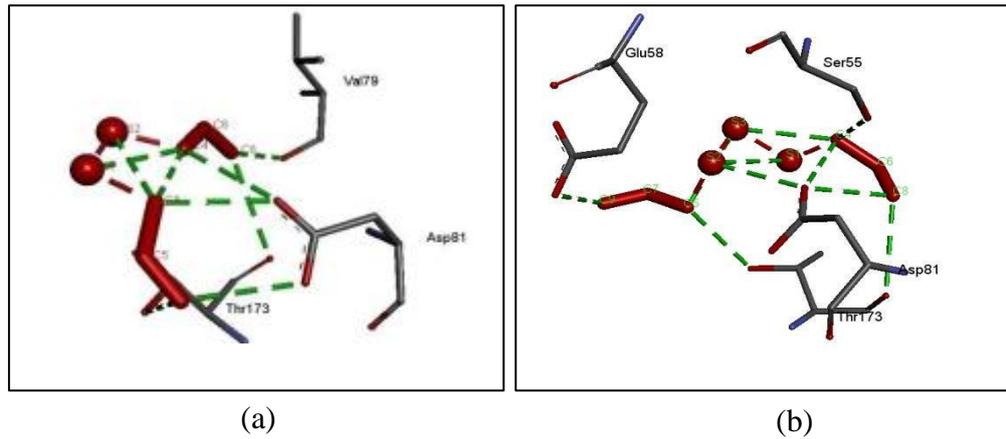
energi ikatan (*binding energy*) menggambarkan kekuatan ikatan yang terjadi antara ligan dengan protein target. Semakin kecil nilai konstanta inhibitor maka akan semakin kecil pula energi ikatan. Maka semakin kecil energi ikatan dan konstanta inhibisi maka akan semakin disukai interaksi antara ligan dengan target (Prasetia, 2011). Hasil skor setiap konformasi antara seluruh ligan terhadap protein dapat dilihat pada lampiran 8. Berikut nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi terbaik serta interaksi antara masing-masing ligan dengan protein target dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Interaksi Ligan dengan Protein Target

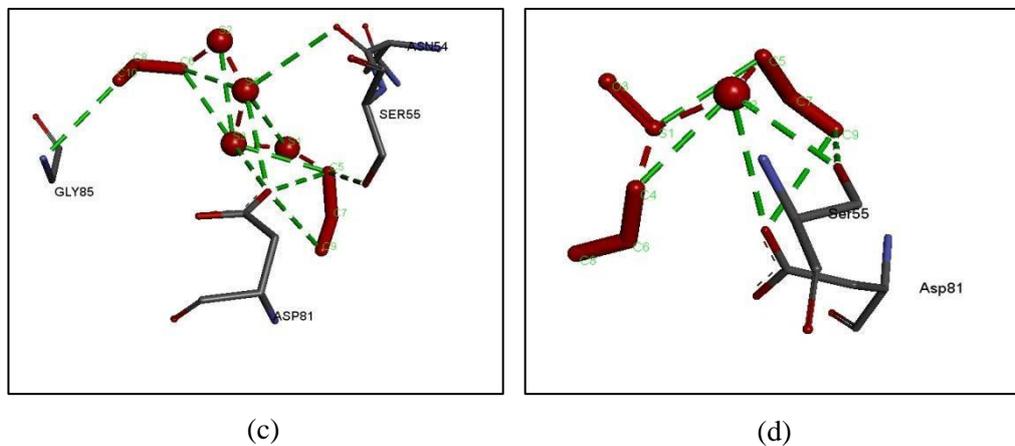
Ligan	Energi Ikatan (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi (KI)	Interaksi
Dialil disulfida	-3,56	2,47 mM	Val79, Asp81 dan Thr173
Dialil trisulfida	-3,83	1,57 mM	Glu58, Ser55, Asp81 dan Thr173
Dialil tetrasulfida	-3,7	1,94 mM	Gly85, Asp81, Ser55 dan Asn54
<i>Allicin</i>	-4,0	1,17 mM	Asp81 dan Ser55
<i>Diethyl mercaptole</i>	-3,74	1,83 mM	Gly85, Asp81, Asn54 dan Thr173
<i>2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin</i>	-4,07	1,04 mM	Asp81, Ser55, Thr173, dan Val79
Siprofloksasin	-5,79	56,73 μ M	Arg84, Asp81, Glu58, Gly85 Ile86, Ile102, dan Ser129
Referensi ligan	-8,15	1,06 μ M	Arg144, Arg84, Asn54, Asp81, Glu58, Ile86, Ser55, Thr173

d. Visualisasi Hasil *Docking*

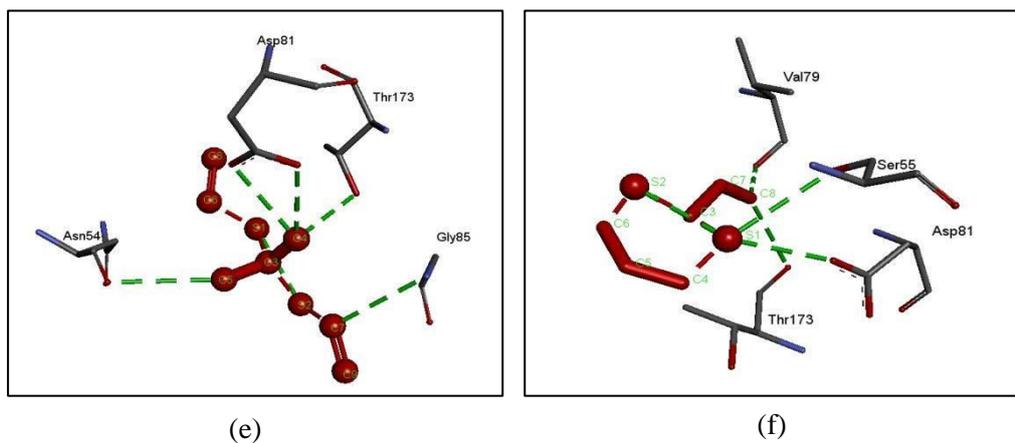
Visualisasi *docking* dilakukan dengan menggunakan *Discovery Studio Visualizer* 4.1. Visualisasi dilakukan terhadap semua ligan senyawa organosulfur dengan target protein bakteri yaitu DNA gyrase subunit B. Hal ini dilakukan untuk mengetahui interaksi antara senyawa organosulfur terhadap protein target. Hasil visualisasi interaksi antara masing-masing ligan dengan protein target disajikan dalam gambar 13, 14, 15, dan 16. Proses *docking* yang telah dilakukan, menghasilkan nilai energi ikatan ligan terhadap protein dan menunjukkan interaksi yang terjadi antara ligan dan protein target. Interaksi tersebut melibatkan berbagai asam amino dan jenis ikatannya, baik ikatan hidrofobik maupun ikatan hidrogen. Jumlah asam amino yang berinteraksi dengan ligan, akan mempengaruhi nilai energi ikatan ligan dengan protein. Dari hasil uji *molecular docking* diketahui bahwa *ref ligand*/ ligan referensi dan siprofloksasin memiliki energi ikatan lebih kecil daripada seluruh senyawa organosulfur. Semakin kecil nilai yang diperoleh menunjukkan bahwa kemampuan mengikat antara protein dan ligan semakin baik atau dengan kata lain, energi minimal yang dikeluarkan dapat digunakan untuk berikatan.



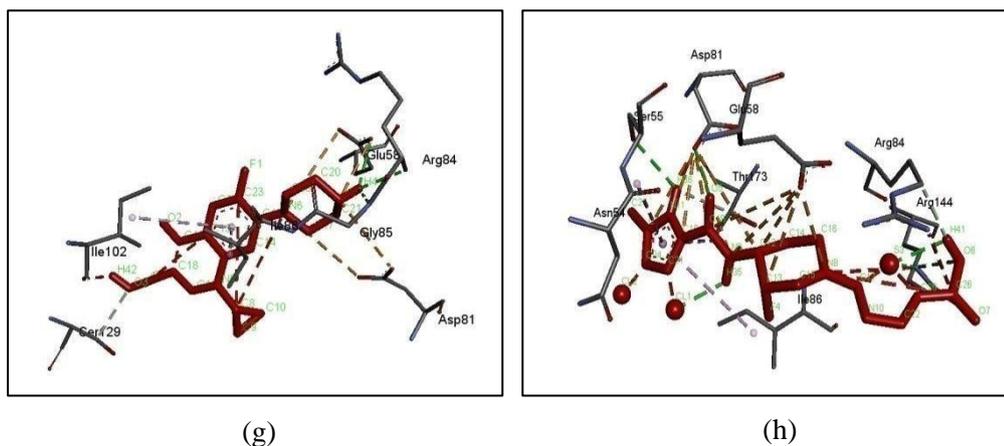
Gambar 13. Interaksi 3D antara (a) Diallyl disulfida (b) Diallyl trisulfida dengan DNA gyrase subunit B



Gambar 14. Interaksi 3D antara (c) Diallyl tetrasulfida (d) *Allicin* dengan DNA gyrase subunit B



Gambar 15. Interaksi 3D antara (e) *Diethyl mercaptole* (f) *2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin* dengan DNA gyrase subunit B



Gambar 16. Interaksi 3D antara (g) Siprofloksasin dan (h) Ref ligan dengan DNA gyrase subunit B

B. Pembahasan

Bawang putih merupakan tanaman herbal parenial yang membentuk umbi lapis dan mengandung senyawa *allicin*. Ketika bawang putih dimemarkan atau dihaluskan, zat *alliin* yang sebenarnya tidak berbau akan terurai. Dengan dorongan enzim *alliinase*, *alliin* terpecah menjadi *allicin*, amonia, dan asam piruvat. Bau tajam *allicin* disebabkan oleh kandungan zat belerang. *Allicin* memiliki sifat yang kurang stabil, oleh karena itu, dalam beberapa jam dalam suhu ruangan akan kembali mengalami metabolisme menjadi *vinylidithiin* dan *ajoene*. Senyawa *ajoene* memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme yang sama dengan *allicin*, namun memiliki potensi yang lebih kecil daripada *allicin* (Deresse, 2010).

Ada beberapa genus *Allium* selain bawang putih yang cukup dikenal, seperti bawang merah (*Allium cepa* L.), lokio (*Allium schoenoprasum* L.), bawang perai (*Allium porrum* L.), shallots (*Allium ascalonicum* L.) dan bawang Welsh (*Allium fistulosum* L.). Komponen utama genus ini adalah flavanoid dan *cytosolic*

sycteine sulfoxides (alliin) yaitu senyawa sulfur organik. Di antara genus *Allium* tersebut, bawang putih merupakan tumbuhan paling dikenal dan sudah terdapat di seluruh belahan dunia (Cobas, *et al.*, 2010; Amagase, *et al.*, 2001; Woodward, 1996; Fenwick dan Hanley, 1985; Block, 1985). Umbi bawang putih berpotensi sebagai agen antimikroba. Kemampuannya menghambat pertumbuhan mikroba sangat luas, mencakup virus, bakteri, protozoa, dan jamur (Nok, *et al.*, 1996; Zhang, 1999; Ohta, *et al.*, 1999; Pizorno dan Murray, 2000; Yin, *et al.*, 2002).

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% selama 24 jam. Penggunaan pelarut etanol pada metode maserasi karena merupakan pelarut yang bersifat universal. Ekstrak etanolik kental yang didapatkan dari 10 kg serbuk simplisia dengan 50 liter etanol 70% (1 : 5 b/v) selanjutnya di fraksinasi dengan pelarut metanol, etilasetat dan heksana. Fraksinasi ekstrak etanolik kental berdasarkan metode ekstraksi cair-cair (*liquid extraction*) sesuai dengan tingkat kepolaran senyawa yaitu sebagai fraksi polar, semipolar dan nonpolar. Ekstrak etanolik yang masih kental diencerkan dengan menggunakan aquadest hangat sehingga ekstrak tidak terlalu kental. Campuran tersebut ditambahkan masing-masing pelarut dan dihomogenkan. Dari hasil penambahan masing-masing pelarut maka akan dihasilkan dua lapisan cairan yang terpisah karena perbedaan massa jenis dari kedua cairan sehingga untuk masing-masing pelarut (metanol/etilasetat/heksana) secara berturut-turut akan mendapatkan senyawa yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Proses fraksinasi ini dilakukan replikasi sebanyak 2 kali. Dari hasil yang didapatkan dari

proses ini untuk fraksi metanol, etilasetat dan heksana secara berturut-turut sebanyak 219,17 g, 2,47 g, dan 2,33 g.

Pembuatan larutan sampel dengan berbagai konsentrasi digunakan aquadest sebagai pelarut pengencer. Aquadest yang digunakan adalah aquadest yang telah disterilisasi dengan cara dipanaskan diatas penangas air. Selain aquadest juga digunakan span 80 sebagai emulgator untuk melarutkan fraksi etilasetat dan heksana karena kedua fraksi tersebut cenderung tidak larut dalam aquadest. Untuk mengetahui nilai DZI dan KHM pada masing-masing fraksi maka dibuat variasi konsentrasi. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi 1%, 5%, 10%, 25%, 50% dan 75% dengan metode Kirby-Bauer. Hasil nilai DZI dapat diinterpretasikan untuk mengetahui KHM dari setiap fraksi. Nilai KHM berfungsi untuk mengetahui konsentrasi minimal dari setiap fraksi pelarut untuk menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Nilai KHM fraksi metanol, etilasetat dan heksana berturut-turut berada pada konsentrasi 50%, 1% dan 1%. Dari hasil tersebut fraksi etilasetat dan heksana memiliki nilai KHM yang sama yaitu pada konsentrasi 1%, namun fraksi heksana memiliki nilai DZI yang lebih besar (13 mm) daripada fraksi etilasetat (9 mm).

Dalam penelitian ini untuk mengetahui adanya aktivitas daya antibakteri dari bawang putih terhadap bakteri *E. coli* menggunakan metode Kirby-Bauer. Metode Kirby-Bauer digunakan untuk menentukan sensitifitas bakteri patogen baik yang bersifat aerob maupun anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa antimikroba (Hudzicki, 2013). Prinsip dari metode ini sederhana, yaitu cawan petri yang berisi agar Mac Conkey diinokulasi dengan bakteri yang diuji yaitu *E. coli*. Cakram

kertas yang digunakan untuk pengujian metode ini mengandung sejumlah agen antimikroba yang dapat berdifusi ke dalam media agar ketika kontak dengan permukaan media. Selama inkubasi agen antimikroba berdifusi ke media agar dan menghambat pertumbuhan bakteri, menghasilkan zona inhibisi di sekitar cakram kertas.

Zona hambat dari ketiga fraksi didapatkan fraksi heksana yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* paling besar yaitu dengan memiliki rata-rata sebesar 13 mm. Hal ini diduga terjadi karena senyawa *allicin* merupakan prekursor pembentukan alil sulfida, dialil disulfida (DADS), dialil trisulfida (DATS), dialil sulfida (DAS), *diethyl mercaptole*, dipropil sulfida, dipropil disulfida, alil merkaptan, alil metil sulfida dimana senyawa-senyawa ini yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri. Produk degradasi *allicin* tersebut biasanya ditemukan di dalam kloroform dan ekstrak minyak bawang putih (Kuda, *et al.*, 2003). Senyawa sulfur turunan alil sulfida dapat tersari dalam pelarut minyak atau pelarut semipolar dan nonpolar. Menurut penelitian Bakht, *et al.*, (2011) membuktikan bahwa ekstrak metanol tidak menunjukkan zona hambat terhadap berbagai bakteri patogen dibandingkan dengan ekstrak etilasetat.

Pada penelitian ini digunakan siprofloksasin (5 µg) sebagai kontrol positif untuk pengujian aktivitas antibakteri, karena merupakan salah satu antibiotik yang mempunyai spektrum kerja yang luas. Siprofloksasin merupakan antibiotik spektrum luas (*broad spectrum*) golongan florokuinolon yang paling umum digunakan (Mohanasundaram dan Shantha, 2000; Chaudhari *et al.*, 2004) dengan mekanisme kerja menghambat DNA girase (topoisomerase II) dan topoisomerase

IV yang terdapat dalam bakteri (Mitchell, 2008). Penghambatan terhadap enzim yang terlibat dalam replikasi, rekombinasi dan reparasi DNA tersebut mengakibatkan penghambatan terhadap pertumbuhan sel bakteri (Sarro, 2001). Sedangkan kontrol negatif digunakan aquadest dan campuran antara aquadest dan span 80.

Hasil penelitian membuktikan bahwa bawang putih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Berdasarkan hasil yang didapat dari ketiga fraksi ekstrak bawang putih, ekstrak bawang putih memiliki efek yang sama seperti antibiotik siprofloksasin sebagai antibakteri. Siprofloksasin adalah antibiotik spektrum luas atau memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif yang pada penelitian ini menggunakan bakteri *E. coli*. Nilai zona hambat yang terbentuk pada 3 x replikasi adalah sebesar 30 mm. Menurut *Performance Standards for Antimicrobial* (2012) mengatakan bahwa antibiotik siprofloksasin dikatakan sensitif terhadap kelompok *Enterobacteriaceae* apabila memiliki DZI >21 mm, sedang 16-20 mm dan resisten <15 mm. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa siprofloksasin dalam kategori kuat atau sensitif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* karena zona hambat yang terbentuk adalah 30 mm. Diameter zona hambat pada semua fraksi bawang putih memiliki nilai lebih rendah dibanding siprofloksasin (5 µg). Hal tersebut disebabkan karena siprofloksasin merupakan senyawa murni, sedangkan ekstrak merupakan campuran senyawa meskipun telah dilakukan metode fraksinasi.

Pengaruh antimikroba juga dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Metanol bersifat polar sehingga senyawa yang tersari relatif bersifat polar. Sedangkan heksana bersifat nonpolar sehingga senyawa yang tersari juga bersifat nonpolar. Dinding sel bakteri gram negatif terdiri atas kandungan lipid yang lebih banyak daripada sel bakteri gram positif yang mayoritas kandungan dinding selnya adalah peptidoglikan. Sehingga, jika senyawa yang bersifat polar sukar untuk melalui dinding sel gram negatif.

Metabolit sekunder yang terkandung di dalam umbi bawang putih membentuk suatu sistem kimiawi yang kompleks serta merupakan mekanisme pertahanan diri dari kerusakan akibat mikroorganisme dan faktor eksternal lainnya. Sistem tersebut juga ikut berperan dalam proses perkembangbiakan tanaman melalui pembentukan tunas (Amagase, *et al.*, 2001). Bawang putih mengandung lebih dari 100 metabolit sekunder yang secara biologi sangat berguna (Challem, 1995). Senyawa ini kebanyakan mengandung belerang yang bertanggung jawab atas rasa, aroma, dan sifat-sifat farmakologi bawang putih (Ellmore dan Fekldberg, 1994). Dua senyawa organosulfur paling penting dalam umbi bawang putih, yaitu asam amino non-volatil *γ-glutamil-S-alk(en)il-L-cystein* dan minyak atsiri *S-alk(en)il-cystein sulfoxide* atau *alliin*. Dua senyawa tersebut menjadi prekursor sebagian besar senyawa organosulfur lainnya. Kadarnya dapat mencapai 82% dari keseluruhan senyawa organosulfur di dalam umbi (Zhang, 1999). Senyawa *γ-glutamil-S-alk(en)il-L-cystein* merupakan senyawa intermediet biosintesis pembentukan senyawa organosulfur lainnya, termasuk *alliin*. Senyawa ini dibentuk dari jalur biosintesis asam amino. Dari *γ-glutamil-S-alk(en)il-L-cystein*,

reaksi enzimatik yang terjadi akan menghasilkan banyak senyawa turunan, melalui dua cabang reaksi, yaitu jalur pembentukan *thiosulfinat* dan *S-allyl cystein* (SAC). Dari jalur pembentukan *thiosulfinat* akan dihasilkan senyawa *allicin*. Selanjutnya dari jalur ini akan dibentuk kelompok alil sulfida, *dithiin*, *ajoene*, dan senyawa sulfur lain (Song dan Milner, 2001).

Komponen senyawa fraksi heksana dan etilasetat dianalisis menggunakan GC-MS ke dalam kolom AGILENTJ%W DB-1 yang bersifat nonpolar karena mengandung fase diam berupa 100% *dimethylpolysiloxane* (Agilent Technologies, 2012) dan fase gerak yang digunakan adalah gas helium. Uji identifikasi GC-MS dilakukan pada fraksi yang signifikan dapat menghambat pertumbuhan *E. coli*, yaitu fraksi etilasetat dan fraksi heksana. Fraksi etilasetat dan heksana yang bersifat relatif nonpolar maka fase diam yang digunakan juga bersifat nonpolar sehingga diharapkan dapat memisahkan komponen-komponen dalam sampel.

Berdasarkan hasil identifikasi dengan menggunakan metode GC-MS membuktikan bahwa dalam fraksi etilasetat dan heksana mengandung senyawa-senyawa organosulfur hasil degradasi *allicin* seperti dialil monosulfida, dialil disulfida, dialil trisulfida, dialil tetrasulfida dan *2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin*. Senyawa-senyawa tersebut telah diketahui memiliki efek sebagai antibakteri (Mikaili, *et al.*, 2013). Sedangkan senyawa *2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin* memiliki efek dalam menghambat agregasi trombosit, siklooksigenase dan 5-lipoksigenase sehingga berperan dalam regulasi tekanan darah. Senyawa organosulfur merupakan senyawa yang diketahui memiliki efek sebagai antibakteri (Mikaili, *et al.*, 2013). Hal tersebut dibuktikan dalam penelitian ini dimana senyawa-senyawa

organosulfur dari fraksi etilasetat dan fraksi heksana memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Allicin pertama kali ditemukan tahun 1944 (Robinkov, *et al.*, 1998), yang akan terbentuk saat bawang yang segar dihancurkan sehingga akan terjadi interaksi *alliin* dan enzim *alliinase*. *Allicin* merupakan senyawa aktif dan memiliki aktivitas biologis seperti antimikroba, antitrombosit, antidiabetes, antihipertensi, antiarterosklerosis, antivirus, antitumor, antikanker (Cobas, *et al.*, 2010). Itulah sebabnya bawang putih merupakan genus *Allium* utama yang paling terkenal dan banyak dikonsumsi sebagai suplemen menurut USDA National Agricultural Statistic Service (Fenwick dan Hanley, 1985).

Senyawa *allicin* tidak stabil oleh panas (Dusica, *et al.*, 2011) sehingga proses ekstraksi perlu dilakukan pada suhu kamar. Hal ini diduga akibat pemanasan pada saat ekstraksi sehingga mampu menurunkan aktivitas antibiotik ekstrak umbi bawang putih karena menghambat aktivitas enzim *alliinase*. Sifat *allicin* yang tidak stabil tersebut mudah mengalami reaksi lanjut, tergantung kondisi pengolahan atau faktor eksternal lain seperti penyimpanan, suhu dan lain-lain.

Allicin merupakan prekursor pembentukan alil sulfida, misalnya dialil disulfida (DADS), dialil trisulfida (DATS), dialil sulfida (DAS), metalil sulfida, dipropil sulfida, dipropil disulfida, alil merkaptan, alil metil sulfida, dll. Kelompok alil sulfida memiliki sifat dapat larut dalam minyak. Oleh karena itu, untuk mengekstraknya digunakan pelarut nonpolar (Gupta dan Porter, 2001). Pembentukan kelompok *ajoene*, serta kelompok *dithiin* juga berawal dari pemecahan *allicin* (Zhang, 1999).

Di dalam bawang putih kandungan dialil disulfida sebesar 60% dan dialil trisulfida sebesar 20% dan sisanya adalah senyawa sulfur lain (Blackwood dan Fulder, 1986). Aktivitas antimikroba dari bawang putih tergantung dari jumlah atom sulfur. Dari senyawa senyawa sulfida yang paling aktif sebagai antimikroba adalah dialil tetrasulfida ($C_6H_{10}S_4$) dan kekuatannya empat kali dari dialil trisulfida ($C_6H_{10}S_3$), sedangkan hasil MIC *allicin* terhadap beberapa bakteri kekuatan daya antimikrobanya sama dengan dialil tetrasulfida (Münchberg, *et al.*, 2007). Blackwood dan Fulder (1986) menyatakan bahwa bawang putih memiliki kandungan dialil disulfida dan dialil trisulfida, disamping dua kandungan utama tersebut juga menghasilkan semua tingkat dan jenis sulfida, disulfida dan trisulfida lain seperti metil alil trisulfida, thiol (methanethiol) serta senyawa lainnya. *Allicin* mempunyai kerja bakterisida dan juga menghambat beberapa enzim secara *in vitro*.

Jumlah unsur pokok aktif (*alliin* dan sulfur) yang ada pada bawang putih tidaklah konstan, melainkan dinamis dan sangat tergantung pada lokasi dan metode pengolahannya, disamping itu tempat dimana bawang putih tersebut ditanam. Perbedaan kandungan sulfur pada bawang putih menjadi sangat penting, karena jumlah sulfur sangat menentukan tingkat aromanya yang berarti pula menjadi ukuran tinggi rendahnya mutu/khasiat dari bawang putih, sedangkan bentuk dan ukuran tidak bisa dijadikan patokan untuk menentukan jumlah kandungan sulfur (Blackwood dan Fulder, 1986).

Mekanisme molekuler senyawa-senyawa organosulfur dapat diteliti melalui pengujian secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Aplikasi

molecular docking yang digunakan adalah AutoDockTools dan protein yang digunakan sebagai target adalah enzim DNA gyrase subunit B. Penggunaan protein DNA gyrase subunit B karena mekanisme antibakteri bawang putih dapat menghambat aktivitas DNA gyrase dan aktivitas lain yang terkait DNA (Prescott, *et al.*, 2005). Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah siprofloksasin, 2-[[3*S*,4*R*]-4-[[3,4-dichloro-5-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)carbonyl]amino]-3-fluoropiperidin-1-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylic acid (referensi ligan) dan senyawa-senyawa organosulfur yang terdeteksi pada analisis GC-MS dari fraksi etilasetat dan heksana.

Hasil analisis *docking* menunjukkan bahwa semua senyawa organosulfur yang terdeteksi dalam analisis GC-MS memiliki efektivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli*. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua senyawa yang diuji memiliki afinitas atau ikatan dalam mengikat protein target. Hasil uji penambatan ligan referensi/ *docking ref ligand* terhadap protein target menunjukkan hasil yang terbaik karena senyawa ini merupakan senyawa *pyrrolamide* yang merupakan ligan asli dari protein ini. *Ref ligand*/ ligan referensi dan siprofloksasin memiliki energi ikatan lebih kecil daripada seluruh senyawa organosulfur. Namun perbedaan energi ikatan antara seluruh senyawa organosulfur dibandingkan dengan siprofloksasin tidak berbeda jauh. Senyawa *vinyl-[4*H*]-1,3-dithiin* merupakan senyawa organosulfur yang memiliki nilai *binding energy* sebesar -4,07 kkal/mol. Sedangkan nilai *binding energy* siprofloksasin dan *ref ligand* berturut-turut adalah -5,79 dan -8,15 kkal/mol. Hasil tersebut membuktikan bahwa senyawa-senyawa organosulfur dalam fraksi

etilasetat dan heksana dari ekstrak etanolik bawang putih memiliki mekanisme yang hampir sama dengan antibiotik siprofloksasin yaitu dengan menghambat aktivitas enzim DNA gyrase subunit B.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap fraksi metanol, etilasetat, dan heksana dari ekstrak etanolik bawang putih (*Allium sativum* L.) dapat disimpulkan bahwa :

1. Fraksi metanol, etilasetat dan heksana dari ekstrak etanolik bawang putih memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*. Fraksi heksana dan etilasetat lebih signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
2. Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa dari fraksi etilasetat dan heksana mengandung senyawa organosulfur seperti dialil monosulfida, dialil trisulfida, dialil disulfida, *allicin*, dll.
3. Hasil uji *docking* menunjukkan bahwa senyawa organosulfur memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat enzim DNA gyrase subunit B.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri bawang putih secara *in vivo*. Uji *docking* senyawa organosulfur juga perlu dilakukan terhadap berbagai protein bakteri untuk mengetahui aktivitas antibakteri terhadap bakteri lain selain *E. coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agilent Technologies. 2012. Agilent J&W GC Column Selection Guide
- Amagase, B.L. Petesh, H. Matsuura, S. Kasuga. Itakura. 2001. Intake of Garlic and its Bioactive components. *Journal of Nutrition*. (131): 955S-962S.
- Anggraeni, M.D. 2012. Uji Disinfeksi Bakteri *E. coli* Menggunakan Kavitas *Water Jet*, *Skripsi*, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.
- Aziz, Syaikhul. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Umbi Bakung Putih (*Crinum Asiaticum* L.) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat. *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Bakht, J., Tayyab, M., Ali, H., Islam, A., Shafi, M. (2011). Effect of different solvent extracted sample of *Allium sativum* (Linn) on bacteria and fungi. *African Journal of Biotechnology*. 10 (31) : 5910-5915
- Barnes., J., Linda, A., & J David, P. 2002. *Herbal Medicine* (2nd ed). London: Pharmaceutical Press.
- Benenson AS (ed.). 1995. *Control of Communicable Diseases Manual*, Sixteenth Edition. United Book Press, Baltimore, pp. 140-150.
- Bergey's, 2005. *Manual of Systematic Bacteriology*. Department of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University. 2nd ed. Vol 1. Part.A.
- Blackwood, J and S. Fulder. 1986. *Garlic: Nature's Original Remedy*. Javelin Books. Poole Dorset. Typeset by Colset Pte Ltd, Singapore. p 126.
- Block, E. 1985. The Chemistry of Garlic and Onions. *Scientific American*. 252(1): 114-119.
- Bonang, G. 1992. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan Edisi 16*. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.
- Branen, A.L dan Davidson, P.M. 1993. *Antimicrobial in Food*. Marcel Dekker. New York.
- Challem, J. 1995. The Wonders of Garlic. Internet address : <http://www.jrthorns.com/Challem/garlic.html>

- Chaudari, S., P. Suryawanshi, S. Ambardekar., M. Chinchwadkar and A. Kinare. 2004. Safety profile of ciprofloxacin used for neonatal septicemia. *Indian Pediatrics*. 41 : 1246-1251.
- Cobas, A.C., Soria, A.C., Martinez, M.C., dan Villamiel, M. (2010). A Comprehensive Survey of Garlic Functionality. *Garlic Consumption and Health*. 1(1): 1-60.
- Crawford Scientific. 2015. Fundamental GC-MS Introduction CHROMacademy, e-learning for the analytical chemistry community.
- Davidson, P.M. 2001. *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*. Food Microbiology. ASM Press, Washington DC.
- Depkes RI. 1986. Farmakope Indonesia, ed 4, Jakarta.
- Ditjen POM. 1979. Farmakope Indonesia. Edisi Ketiga. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. Hal:712.
- Dorland, Newman. 2002. Kamus Kedokteran Dorland. Edisi 29, Jakarta: EGC, hal 1765.
- Douglas, F. 2015. GC/MS analysis. Scientific Testimony, An Online Journal
- DrugBank. 2015. Ciprofloxacin. Diakses dari <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00537>
- Dusica, P. Ilic., Vesna, D., Nikolic, Ljubisa B., Nikolic, Mihajlo Z., Stankovic, Ljiljana P. Stanojevic, Milorad D. Cakic. 2011. Allicin And Related Compunds: Biosynthesis, Synthesis and Phamacological Activity. (9) : 9-20.
- Eja, M.E., Arikpo, G.E., Enyi-Idoh, K.H., dan Ikpeme, E.M. 2011. An Evaluation of The Antimicrobial Synergy of Garlic (*Allium sativum*) and Utazi (*Gongronema latifolium*) on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *Malaysian Journal of Microbiology*. 7(1): 49-53.
- Eja, M.E., Asikong B.E., Abriba, C., Arikpo, G.E., Anwan, E.A., Enyi-Idoh, K.E. 2007. A Comparative Assessment of the Antimicrobial Effects of Garlic (*Allium sativum*) and Antibiotics on Diarrheagenic Organism. *Southeast Asian Jurnal of Tropical Medicine Public Health*. 38 (1) : 343-348
- Ellmore, G. and R. Feldberg. 1994. Alliin lyase localization in bundle sheaths of garlic clove (*Allium sativum*). *American Journal of Botany* 81: 89-95.

- EUCAST. 2012. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 3.0. Sweden. From www.eucast.org
- Febriyanti, T., Andayani, D.R., Jos, B. (2004). Peningkatan Mutu Light Cycle Oil (LCO) Dengan Cara Ekstraksi Cair-cair Menggunakan Solvent Dimethylformamide (DMF). Laporan Penelitian, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
- Feldberg, R.S. 1988. In Vitro Mechanism of Inhibition of Bacterial Cell Growth by Allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(12), pp. 1763.
- Fenwick, G. R., dan Hanley, A. B. (1985) The genus *Allium*. Part 2. *Crit. Review Food Science Nutraceutical*. 22(1): 273–377.
- Gandjar, I.G., Abdul Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., dan Smith, B. (2002). Onions – A Global Benefit to Health. *Phytotherapy Research*. 16(1): 603-615
- Gritter, R.J., Hobbit, J.M., dan Schwarting, A.E. 1991, *Pengantar Kromatografi*, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung.
- Gupta, N. and T.D. Porter. 2001. Garlic and garlic derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. *Journal of Nutrition* 131: 1662–1667.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Edisi 2, ITB. Bandung. hal 123-129.
- Herbert, R.B. 1995. *Hiosinlesisi Metabolit Sekunder*, IKIP Semarang Press, Semarang.
- Hudzicki, J. (2013). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. Retrieved 1 Mei, 2015, from <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>
- Hughes, B.G., Lawson, L.D. (1991). Antimicrobial Effects of *Allium sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* (elephant garlic) and *Allium cepa* L. (onion), Garlic Compounds and Commercial garlic Supplement Products. *Phytother Res*. 5 : 154-158

- Ilic, D.P., Nikolic, V.D., Nikolic, L.B., Stankovic, M.Z., Stanojevic, L.P., Cacic, M.D. 2011. Allicin and Related Compounds : Biosynthesis, Synthesis and Pharmacological Activity. *Physics, Chemistry and Technology*. 9 (1) : 9-20
- Inawati, Dwi. 2011. Pengaruh Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum* var. Lumbu Hijau) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*, *Salmonella thypi* dan *E. coli*. Skripsi. Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember.
- Inayati, H. 2007. Potensi antibakteri ekstrak daun kedondong bangkok. *Skripsi*. Departemen Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor.
- Irianto, Koes. 2006. Mikrobiologi. Bandung: Yrama Widya. P. 76
- Japan Electron Optics Laboratory (JEOL). 2006. Mass spectrometers : a short explanation for the absolute novice. USA.
- Jawetz., E, Melnick, J., Adelberg, E., 1995, Medical Microbiology, 20th ed., Appleton & Lange, Connecticut.
- Jawetz, E. Adelberg, E.A and Melnick, J. 1996. Mikrobiologi Kedokteran. Terjemahan Enugroho E & Maulana RF. Edisi ke-20. Jakarta: EGC.
- Kanazama, A.T. Ikeda T, Endo. 1995. A Novel approach to made of action on cationic biocides: morfological effect on antibacterial activity. *J Appl. Bacterial*, 78: 55-60.
- Kemper, K.J. 2000. Garlic (*Allium sativum*). *The Longwood Herbal Task Force*, Artikel. Diakses 16 Mei 2014, dari <http://www.longwoodherbal.org/garlic>.
- Kitchen, Douglas., B, Helene Decornez, Jhon R. Furr dan Jürgen Bajorath. 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and application. *Nature Reviews. Drug Discovery* vol 3.
- Kuda, A. Iwai and T. Yano, Effect of red pepper *Capsicum annum* var. conoides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow, *Food and Chemical. Toxicology*, 42 (10), 1695-1700 (2004).
- Lingga, M.E., dan Rustama, M.M. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Air dan Etanol Bawang Putih (*Allium Sativum L.*) Terhadap Bakteri Gram Negatif Dan Gram Positif Yang Diisolasi Dari Udang Dogol (*Metapenaeus*

- Monoceros*), Udang Lobster (*Panulirus Sp*), Dan Udang Rebon (*Mysis Dan Acetes*), *skripsi*. FMIPA, Universitas Padjadjaran.
- List, P.H., dan Schmidt, P.C. 1989. *Phytopharmaceutical Technology*, 1-2, CRC Press Florida.
- Mikaili, P., Maadirad, S., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S., Sarahroodi, S. (2013). Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of Garlic, Shallot, and Their Biologically Active Compounds. *Iran J Basic Med Sci.* 16 (10) : 1031-1048.
- Mitchell, R. and N. Cranswick. 2008. What Is The Evidence of Safety of Quinolone Use In Children. *International Child Health Review Collaboration*.
- Mohanasundaram, J. and S. Mohanasundaram. 2001. Effect of duration oftreatment on ciprofloxacin induced arthropathy in young rats. *Indian Journal of Pharmacology.* 33 : 100-103.
- Motiejunas, D., Wade, R. 2006. *Structural, Energetics, and Dynamic Aspects of Ligand-Receptor Interactions*.
- Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar (edisi 2)* (Agus, A., penerjemah). Jakarta: Widya Medika.
- Münchberg, U., A. Anwar, S. Mecklenburg and C. Job. 2007. Polysulfides as biological active ingredient softgarlic. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Internet address: www.rsc.org/obc
- Nataro, J.P and Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *E. coli*. *Clinical Micro Reviews:* 11 (1):142-201.
- Nikolic, V. 2003. *Synthesis and Characterization of Allicin, its Derivates and Inclusion Complexes (In Serbian)*, Ph.D Thesis. Faculty of Technology. Leskovac.
- Nok, A.J., S. Williams, and P.C. Onyenekwe. 1996. *Allium sativum*-induced death of African trypanosomes. *Parasitology Research* 82: 634–637.
- Nycas dan Tassou. 2000. Traditional preservative and spices. *Encyclopedia of food microbiology volume 1*. Academy Press London.
- Ohta, R., N. Yamada, H. Kaneko, K. Ishikawa, H. Fukuda T. Fujino, and A. Suzuki. 1999. In vitro inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-

- macerated garlic constituents. *Antimicrobial Agent and Chemistry* 43 (7): 1811–1812.
- Omar, S.H, and Al-Wabel, N.A. 2009. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharm J.* 2010 Jan; 18(1): 51–58.
- Pelczar, M.J., & Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Jilid 1. UI Press, Jakarta.
- Pelczar, M.J., & Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Jilid 2. UI Press, Jakarta.
- Pizorno, J.E. and M.T. Murray. 2000. *A Textbook of Natural Medicine: Allium sativum*. Edisi ke-2. Washington: Bastyr University.
- Prasetia, T. 2011. Simulasi Dinamika Molekul Kompleks *Histone Deacetylase* (HDAC) Kelas II Homo Sapiens dengan *Suberoylanilide Hydroxamic Acid* (SAHA) dan Turunannya sebagai Inhibitor Kanker Serviks. Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 2005. *Microbiology*. 6th Ed. Mc Graw Hill. Boston. p. 992.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta : Penerbit Airlangga. Hal 22-42, 188-189.
- Refdanita (dkk). 2004. Pola Kepekaan Kuman terhadap Antibiotik di ruang Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002. *Makara Kesehatan*, Vol. 8. No. 2. Desember 2004: 41-48.
- Rignanese, L. 2005. *Allium sativum*. Retrieved 4 Juni 2014, from http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?src=photos_index&where-taxon=Allium+sativum
- Robinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L. (1998). The mode of action of allicin: Trapping of radicals and teraction with thiol containing proteins, *Biochem. Biophys.* 139(7): 233– 244.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke 6. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB, Bandung. Hal 318-322.
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta : Widya Medika.

- Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A.I. 2006. Natural Product Isolation (An Overview), dalam Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray., A.I. (Eds.), *Natural Products Isolation*, 2nd., 17-18, Humana Press, New Jersey.
- Sarro, A.D. and G.D. Sarro. 2001. Adverse Reactions to Fluoroquinolones. An Overview on Mechanism Aspects. *Current Medicinal Chemistry*. 8 : 371-384.
- Sastrohamidjojo, H. 1991. Spektrosfotokopi. Edisi kedua. Jogjakarta: Penerbit Liberty.
- Sihombing, Ninda T.M. 2015. Antibakteri Ekstrak Air Bawang Putih (*Allium Sativum* L.) dan Hasil Hidrolisis Enzimatis Minyak Kelapa Murni Serta Kombinasinya Terhadap Beberapa Bakteri Penyebab Diare. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatera Utara.
- Silverstein, R.M., Terrence, C.M. dan Clayton, B. 1981. Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York: John Wiley & Sons. p. 3-14, 102-105
- Smith-Keary P. F., 1988, Genetic Elements in *E. coli*, Macmillan Molecular biology series, London, p. 1-9, 49-54.
- Song, K & Miller, J., A. 2001. Heating garlic inhibits its ability to suppress 7,12 dimethylbenz (a) anthraceneinduced DNA adduct formation in rat mammary tissue. *Journal of Nutrition*. (129) : 657-661.
- Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. 2006. Protein-Ligand Docking : Current Status and Future Challenges. *Wiley InterScience*. 65 : 15-26
- Sudjarwo, S.A., Wisnu Setyari & Koerniasari. Potency of garlic extract (*Allium sativum*) as analgesic and antipyretic. 2004. Departement of Pharmacology, Airlangga University School of Medicine. Surabaya: *Jurnal Kedokteran Yarsi* 12 (2), 2004; 79-84.
- Sumthong, P., dan Verpoorte, R. 2012. Screening for Antimicrobial Activity. <http://openaccess.leidenuniv.nl>. Diakses 25 Mei 2015.
- Tattleman E. 2005. Health of Garlic. *American Family Physician J*. p 72: 103-6.
- Teodoro, M.L., Phillips Jr, G.N., Kavraki, L.E. 2001. Molecular Docking : A Problem With Thousand of Degrees of Freedom

- United States Food & Drug Administration. Enteropathogenic E. coli. Internet address: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap14.html>
- Utami, P. 2012. Antibiotik Alami untuk Mengatasi Aneka Penyakit, Cetakan I, 23-24, AgroMedia Pustaka, Jakarta.
- Van Bramer, S.E. 1998. An introduction to mass spectrometry. Department of Chemistry, Widener University, Chester
- Volk, W.A., dan Weller, M.F. 1989. Mikrobiologi Dasar. Edisi V. Jilid II. Jakarta: Penerbit Erlangga. Halaman 130-150.
- Wiryanan, K. G., Suharti, S. & Bintang, M. 2005. Kajian Antibakteri Temulawak, Jahe dan Bawang Putih terhadap *Salmonella typhimurium* serta Pengaruh Bawang Putih terhadap Performans dan Respon Imun Ayam Pedaging. Med. Pet. 22 : 52-62.
- Woodward, P. (1996). Garlic and Friends: The History, Growth, and Use of Edible Allium. South Melbourne: Hyland House. Halaman 336.
- World Health Organization. 2006. Implementing the new recommendation on the clinical management of diarrhea. Guidelines for policy makers and programme managers. Geneva: WHO.
- Yamada, Y and K. Azama. 1997. *Antimicrobe Agents Chemotherapy*. 743 dalam <http://www.sirisimpex.com/garlic.html>, diakses tanggal 10 Mei 2014.
- Yin, M.C., H.C. Chang, and S.M. Tsao. 2002. Inhibitory effects of aqueous garlic extract, garlic oil and four dialil sulphides against four enteric pathogens. *Journal of Food and Drug Analysis* 10 (2): 120- 126.
- Zhang, X. 1999. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants: *Bulbus Allii Sativii*. Geneva: World Health Organization.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Determinasi



**BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA**

Alamat: Sekip Utara Jl. Kaliurang Km 4, Yogyakarta 55281
Telp. , 0274.542738, 0274.649.2568 Fax. +274-543120

SURAT KETERANGAN

No.: BF/2014/Ident/Det/VI/2914

Kepada Yth. :
Sdri/Sdr. Rizki Amalia Rahmah
NIM. 20110350040
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
Di Yogyakarta

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi sampel yang Saudara kirimkan ke Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

No.Pendaftaran	Jenis	Suku
202	<i>Allium sativum</i> L.	Liliaceae

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 1 Juni 2014

Ketua



Dr. Walfyono, SU., Apt.
NIP. 195007011977021001

Lampiran 2. Hasil Analisis Data dengan SPSS

Descriptives

DZI	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					metanol	6		
etil asetat	6	7.3833	1.07781	.44001	6.2522	8.5144	6.00	9.00
heksana	6	9.3333	2.06559	.84327	7.1656	11.5010	7.00	13.00
Total	18	6.2944	3.82507	.90158	4.3923	8.1966	.00	13.00

Analisis Normalitas Data

Tests of Normality

perlakuan	DZI	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
metanol		.406	6	.002	.673	6	.003
etil asetat		.306	6	.084	.906	6	.410
heksana		.231	6	.200*	.915	6	.473

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Analisis Varians

Test of Homogeneity of Variances

DZI			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.811	2	15	.014

Analisis *One Way* ANOVA

ANOVA

DZI					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	164.754	2	82.377	14.715	.000
Within Groups	83.975	15	5.598		
Total	248.729	17			

*Analisis Multiple Comparison Uji Tukey***DZI**

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
metanol	6	2.1667	
etil asetat	6		7.3833
heksana	6		9.3333
Sig.		1.000	.352

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 3. Kondisi GC-MS



Lab Kimia Organik FMIPA - UGM

GCMS-QP2010S SHIMADZU
 Kolom :AGILENTJ%W DB-1
 Panjang : 30 meter
 ID : 0,25 mm
 Gas pembawa : Helium
 Pengionan : EI
 70 Ev

[Comment]

----- Analytical Line 1 -----

[GC-2010]

Column Oven Temp. :50.0 °C
 Injection Temp. :310.00 °C
 Injection Mode :Split
 Flow Control Mode :Pressure
 Pressure :12.0 kPa
 Total Flow :29.8 mL/min
 Column Flow :0.54 mL/min
 Linear Velocity :26.6 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :49.0
 High Pressure Injection :OFF
 Carrier Gas Saver :OFF
 Splitter Hold :OFF
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	50.0	5.00
5.00	260.0	43.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes
 SPLI : Yes
 MS : No

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPLI Carrier : Yes

[GC Program]

[GCMS-QP2010]
 IonSourceTemp :250.00 °C
 Interface Temp. :305.00 °C
 Solvent Cut Time :2.00 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :+0.00 kV
 Threshold :0

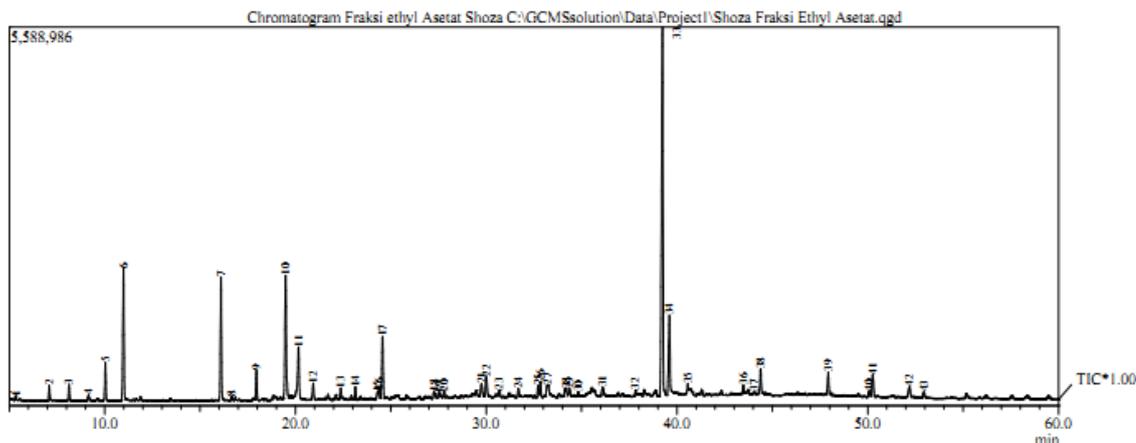
[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time :2.20min
 End Time :90.00min
 ACQ Mode :Scan
 Event Time :0.50sec
 Scan Speed :1250
 Start m/z :28.00
 End m/z :600.00

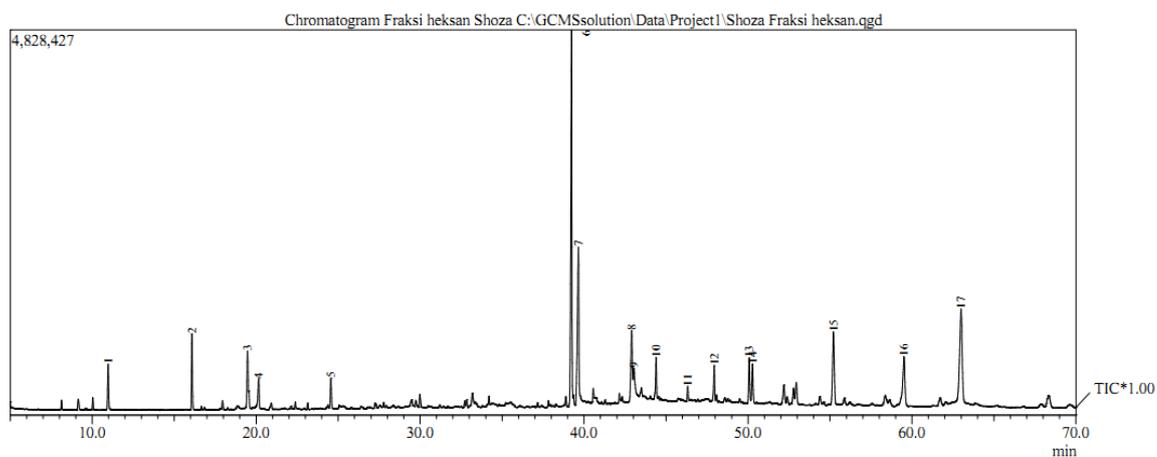
Sample Inlet Unit :GC

Lampiran 4. Kromatogram Fraksi Etilasetat



Peak Report TIC							
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Name
1	5.339	5.292	5.383	159945	0.17	57518	
2	7.089	7.033	7.183	711931	0.77	218624	
3	8.132	8.067	8.225	838780	0.91	240602	
4	9.152	9.092	9.242	306947	0.33	67008	
5	10.037	9.958	10.133	1994564	2.16	555877	
6	10.988	10.875	11.083	8127490	8.79	1929904	
7	16.096	16.000	16.217	7167133	7.75	1809356	
8	16.661	16.617	16.725	183682	0.20	56967	
9	17.956	17.875	18.050	1742599	1.88	444055	
10	19.483	19.375	19.642	8860361	9.58	1793730	
11	20.160	20.008	20.275	3829960	4.14	731042	
12	20.932	20.858	21.008	880048	0.95	225869	
13	22.380	22.308	22.450	554004	0.60	150544	
14	23.147	23.083	23.217	696902	0.75	185476	
15	24.300	24.242	24.350	458610	0.50	93136	
16	24.378	24.350	24.450	428256	0.46	128493	
17	24.567	24.450	24.675	4422122	4.78	911911	
18	27.265	27.192	27.300	229028	0.25	63079	
19	27.525	27.467	27.742	349606	0.38	64945	
20	27.789	27.742	27.867	369210	0.40	95936	
21	29.751	29.667	29.875	1051985	1.14	179711	
22	30.004	29.892	30.117	1490071	1.61	298406	
23	30.691	30.642	30.783	292815	0.32	81682	
24	31.685	31.617	31.767	530264	0.57	121310	
25	32.722	32.658	32.783	647011	0.70	161973	
26	32.840	32.783	32.933	925919	1.00	222280	
27	33.209	33.108	33.333	1185003	1.28	148431	
28	34.204	34.067	34.267	713240	0.77	100462	
29	34.375	34.317	34.458	332297	0.36	91076	
30	34.824	34.750	34.892	249352	0.27	60325	
31	36.108	36.017	36.233	770750	0.83	125152	
32	37.819	37.767	37.875	223591	0.24	75652	
33	39.240	39.075	39.350	29659806	32.08	5421203	
34	39.606	39.350	39.708	5527393	5.98	1132217	
35	40.569	40.508	40.617	364071	0.39	114638	
36	43.482	43.417	43.558	448951	0.49	123473	
37	44.033	44.000	44.275	48546	0.05	35116	
38	44.388	44.275	44.467	1544908	1.67	355208	
39	47.935	47.858	48.017	1233871	1.33	305444	
40	50.067	50.008	50.175	309812	0.34	72388	
41	50.271	50.175	50.375	1769896	1.91	321773	
42	52.184	52.125	52.283	498050	0.54	111083	
43	52.948	52.883	53.033	328157	0.35	70174	

Lampiran 5. Kromatogram Fraksi Heksana



Peak Report TIC							
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Name
1	10.972	10.875	11.075	2407173	2.04	568198	
2	16.087	15.992	16.192	3601898	3.06	953838	
3	19.470	19.367	19.642	3906283	3.31	706739	
4	20.153	20.050	20.258	1612103	1.37	341053	
5	24.554	24.467	24.667	1760850	1.49	378964	
6	39.234	39.067	39.308	23569330	20.00	4643012	
7	39.653	39.467	39.775	11689679	9.92	1913514	
8	42.904	42.767	42.983	5241242	4.45	856013	
9	43.035	42.983	43.208	2325733	1.97	361958	
10	44.393	44.308	44.492	1827532	1.55	488431	
11	46.326	46.250	46.400	707608	0.60	184991	
12	47.934	47.842	48.017	1856135	1.58	429120	
13	50.071	49.967	50.167	2825297	2.40	568688	
14	50.273	50.167	50.392	2807776	2.38	490324	
15	55.211	55.050	55.358	6477326	5.50	903258	
16	59.508	59.367	59.683	4264644	3.62	541610	
17	62.992	62.775	63.200	11914407	10.11	1142286	
18	75.396	75.017	75.667	29046839	24.65	1688658	
				117841855	100.00	17160655	

Lampiran 6. Hasil *Mass Spectrometer* Fraksi Etilasetat

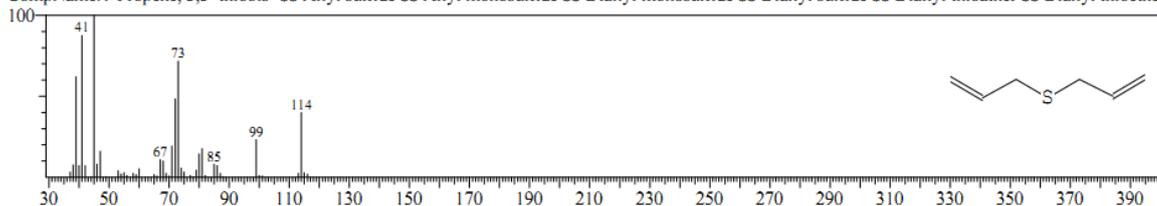
Peak : 3

Waktu retensi : 8,133 menit

Hit#:2 Entry:2944 Library:NIST62.LIB

SI:95 Formula:C₆H₁₀S CAS:592-88-1 MolWeight:114 RetIndex:0

CompName:1-Propene, 3,3'-thiobis- SS Allyl sulfide SS Allyl monosulfide SS Diallyl monosulfide SS Diallyl sulfide SS Diallyl thioether SS Diallyl thioether



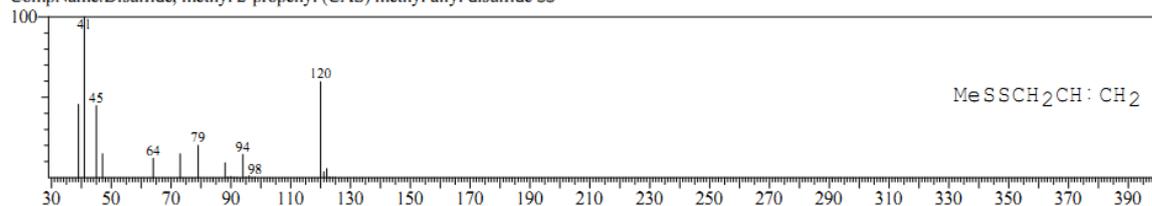
Peak : 5

Waktu retensi : 10,033 menit

Hit#:1 Entry:11474 Library:WILEY229.LIB

SI:84 Formula:C₄H₈S₂ CAS:2179-58-0 MolWeight:120 RetIndex:0

CompName:Disulfide, methyl 2-propenyl (CAS) methyl allyl disulfide SS



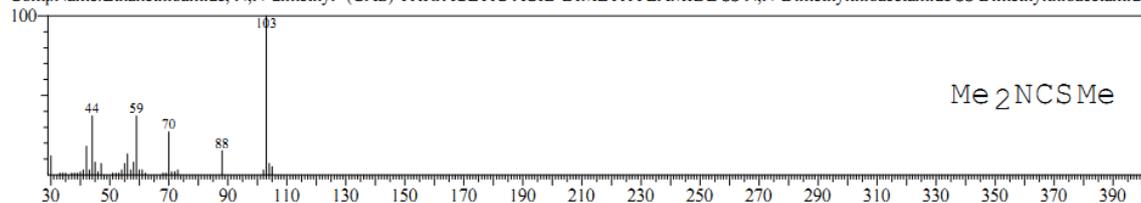
Peak : 6

Waktu retensi : 10,992 menit

Hit#:1 Entry:6363 Library:WILEY229.LIB

SI:69 Formula:C₄H₉N₂S CAS:631-67-4 MolWeight:103 RetIndex:0

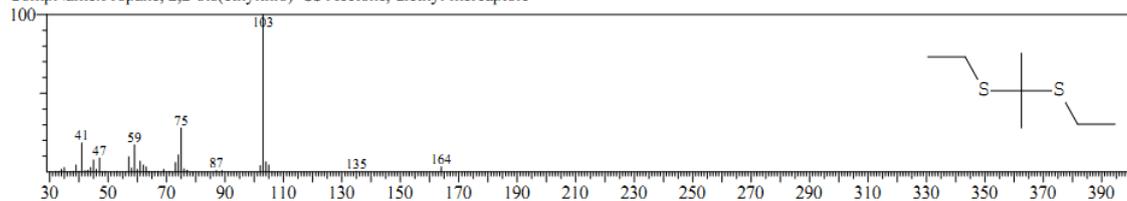
CompName:Ethanethioamide, N,N-dimethyl- (CAS) THIOACETIC ACID DIMETHYLAMIDE SS N,N-Dimethylthioacetamide SS Dimethylthioacetamide



Hit#:2 Entry:13322 Library:NIST62.LIB

SI:68 Formula:C₇H₁₆S₂ CAS:14252-45-0 MolWeight:164 RetIndex:0

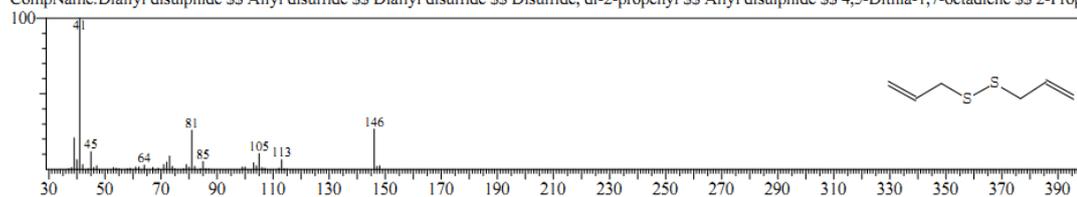
CompName:Propane, 2,2-bis(ethylthio)- SS Acetone, diethyl mercaptole



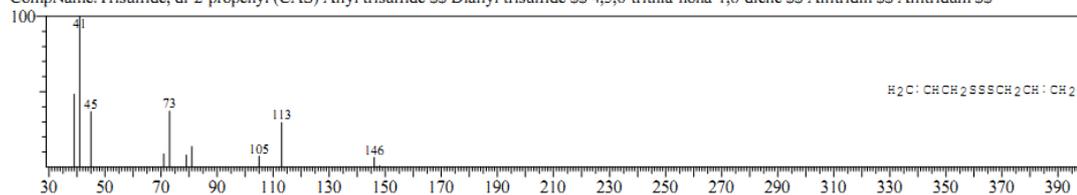
Peak : 7

Waktu retensi : 16,100 menit

Hit#:1 Entry:8750 Library:NIST62.LIB
 SI:90 Formula:C6H10S2 CAS:2179-57-9 MolWeight:146 RetIndex:0
 CompName:Diallyl disulphide SS Allyl disulfide SS Diallyl disulfide SS Disulfide, di-2-propenyl SS Allyl disulphide SS 4,5-Dithia-1,7-octadiene SS 2-Prope



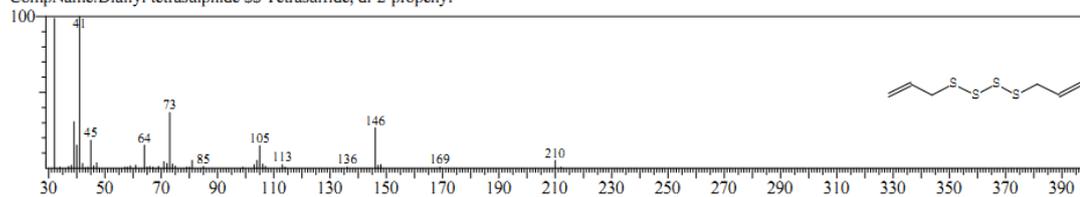
Hit#:4 Entry:48536 Library:WILEY229.LIB
 SI:80 Formula:C6H10S3 CAS:2050-87-5 MolWeight:178 RetIndex:0
 CompName:Trisulfide, di-2-propenyl (CAS) Allyl trisulfide SS Diallyl trisulfide SS 4,5,6-trithia-nona-1,8-diene SS Allitridin SS Allitridum SS



Peak : 8

Waktu retensi : 16,658

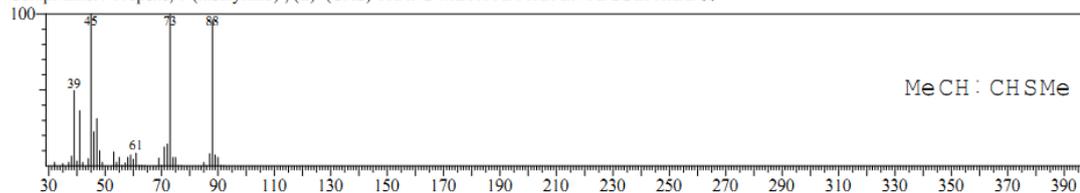
Hit#:1 Entry:25190 Library:NIST62.LIB
 SI:80 Formula:C6H10S4 CAS:2444-49-7 MolWeight:210 RetIndex:0
 CompName:Diallyl tetrasulphide SS Tetrasulfide, di-2-propenyl



Peak : 9

Waktu retensi : 17,598

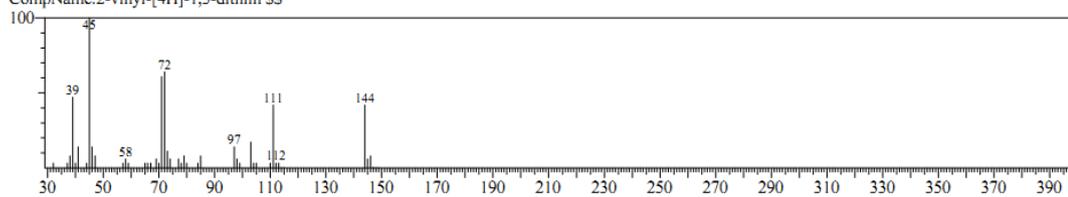
Hit#:1 Entry:3214 Library:WILEY229.LIB
 SI:78 Formula:C4H8S CAS:42848-06-6 MolWeight:88 RetIndex:0
 CompName:1-Propene, 1-(methylthio)-, (E)- (CAS) TRANS-METHYL PROPENYL SULPHIDE SS



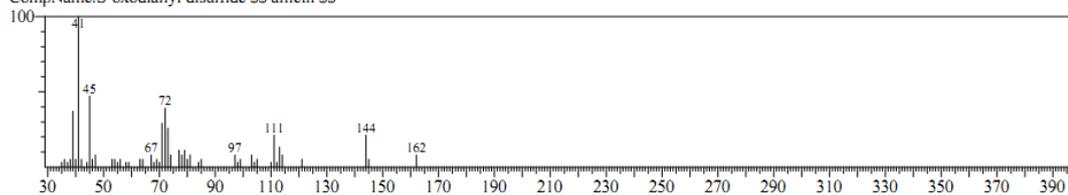
Peak : 11

Waktu retensi : 20,158 menit

Hit#:1 Entry:23805 Library:WILEY229.LIB
SI:88 Formula:C6 H8 S2 CAS:0-00-0 MolWeight:144 RetIndex:0
CompName:2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin SS



Hit#:3 Entry:36492 Library:WILEY229.LIB
SI:76 Formula:C6 H10 O S2 CAS:0-00-0 MolWeight:162 RetIndex:0
CompName:S-oxidiallyl disulfide SS alliin SS

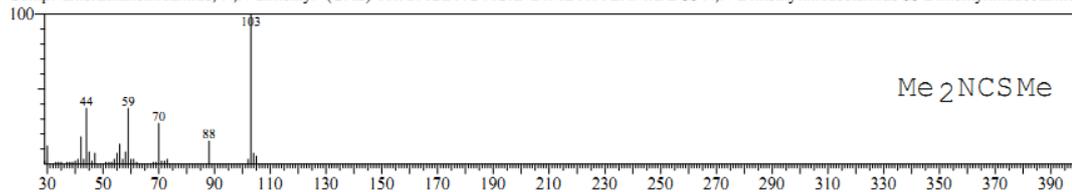


Lampiran 7. Hasil Mass Spectrometer Fraksi Heksana

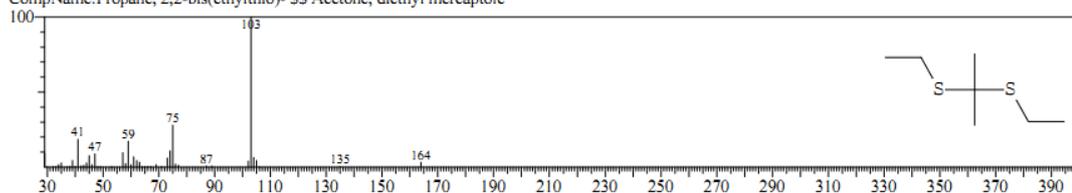
Peak : 1

Waktu retensi : 10,975 menit

Hit#:1 Entry:6363 Library:WILEY229.LIB
 SI:69 Formula:C4 H9 N S CAS:631-67-4 MolWeight:103 RetIndex:0
 CompName:Ethanethioamide, N,N-dimethyl- (CAS) THIOACETIC ACID DIMETHYLAMIDE SS N,N-Dimethylthioacetamide SS Dimethylthioacetamide



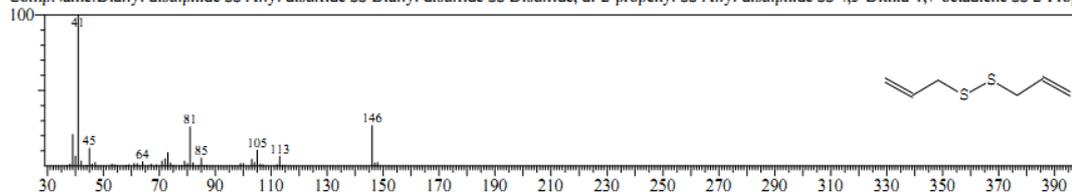
Hit#:2 Entry:13322 Library:NIST62.LIB
 SI:68 Formula:C7H16S2 CAS:14252-45-0 MolWeight:164 RetIndex:0
 CompName:Propane, 2,2-bis(ethylthio)- SS Acetone, diethyl mercaptole



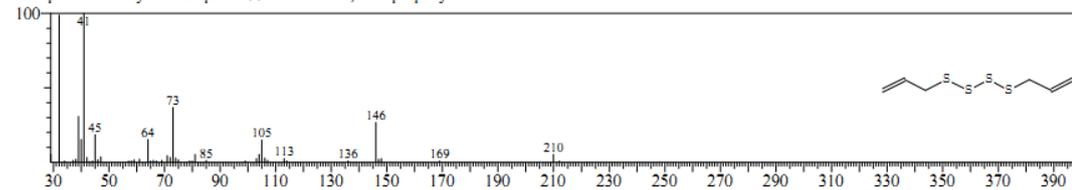
Peak : 2

Waktu retensi : 16,083 menit

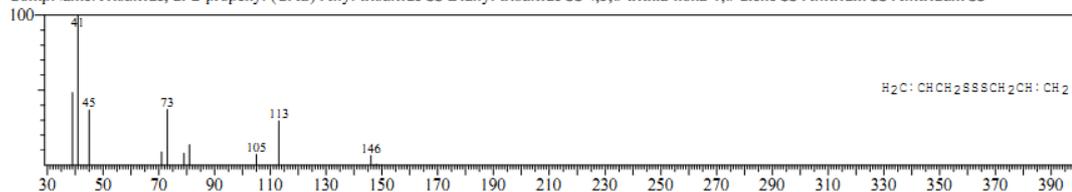
Hit#:1 Entry:8750 Library:NIST62.LIB
 SI:90 Formula:C6H10S2 CAS:2179-57-9 MolWeight:146 RetIndex:0
 CompName:Diallyl disulphide SS Allyl disulfide SS Diallyl disulfide SS Disulfide, di-2-propenyl SS Allyl disulphide SS 4,5-Dithia-1,7-octadiene SS 2-Propene



Hit#:2 Entry:25190 Library:NIST62.LIB
 SI:83 Formula:C6H10S4 CAS:2444-49-7 MolWeight:210 RetIndex:0
 CompName:Diallyl tetrasulphide SS Tetrasulfide, di-2-propenyl



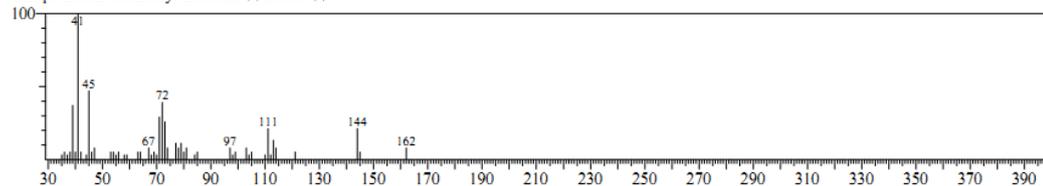
Hit#:5 Entry:48536 Library:WILEY229.LIB
 SI:79 Formula:C6 H10 S3 CAS:2050-87-5 MolWeight:178 RetIndex:0
 CompName:Trisulfide, di-2-propenyl (CAS) Allyl trisulfide SS Diallyl trisulfide SS 4,5,6-trithia-nona-1,8-diene SS Allitridin SS Allitridum SS



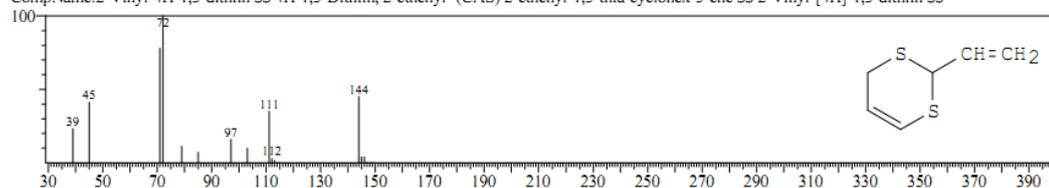
Peak : 3

Waktu retensi : 19,467 menit

Hit#:3 Entry:36492 Library:WILEY229.LIB
 SI:73 Formula:C6 H10 O S2 CAS:0-00-0 MolWeight:162 RetIndex:0
 CompName:S-oxodiallyl disulfide SS allicin SS



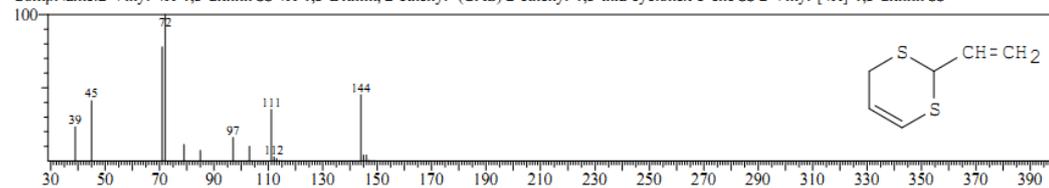
Hit#:4 Entry:23802 Library:WILEY229.LIB
 SI:70 Formula:C6 H8 S2 CAS:80028-57-5 MolWeight:144 RetIndex:0
 CompName:2-Vinyl-4H-1,3-dithiin SS 4H-1,3-Dithiin, 2-ethenyl- (CAS) 2-ethenyl-1,3-thia-cyclohex-5-ene SS 2-Vinyl-[4H]-1,3-dithiin SS



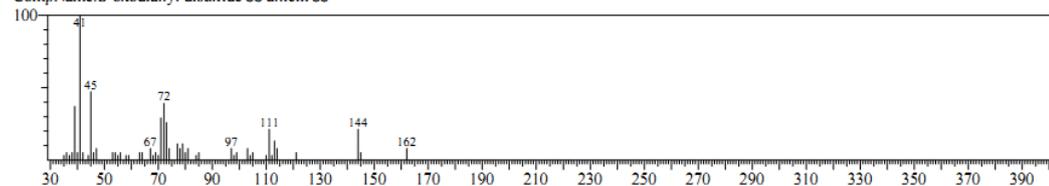
Peak : 4

Waktu retensi : 20,150 menit

Hit#:2 Entry:23802 Library:WILEY229.LIB
 SI:85 Formula:C6 H8 S2 CAS:80028-57-5 MolWeight:144 RetIndex:0
 CompName:2-Vinyl-4H-1,3-dithiin SS 4H-1,3-Dithiin, 2-ethenyl- (CAS) 2-ethenyl-1,3-thia-cyclohex-5-ene SS 2-Vinyl-[4H]-1,3-dithiin SS



Hit#:3 Entry:36492 Library:WILEY229.LIB
 SI:76 Formula:C6 H10 O S2 CAS:0-00-0 MolWeight:162 RetIndex:0
 CompName:S-oxodiallyl disulfide SS allicin SS



Lampiran 8. Konformasi Hasil *Molecular Docking*

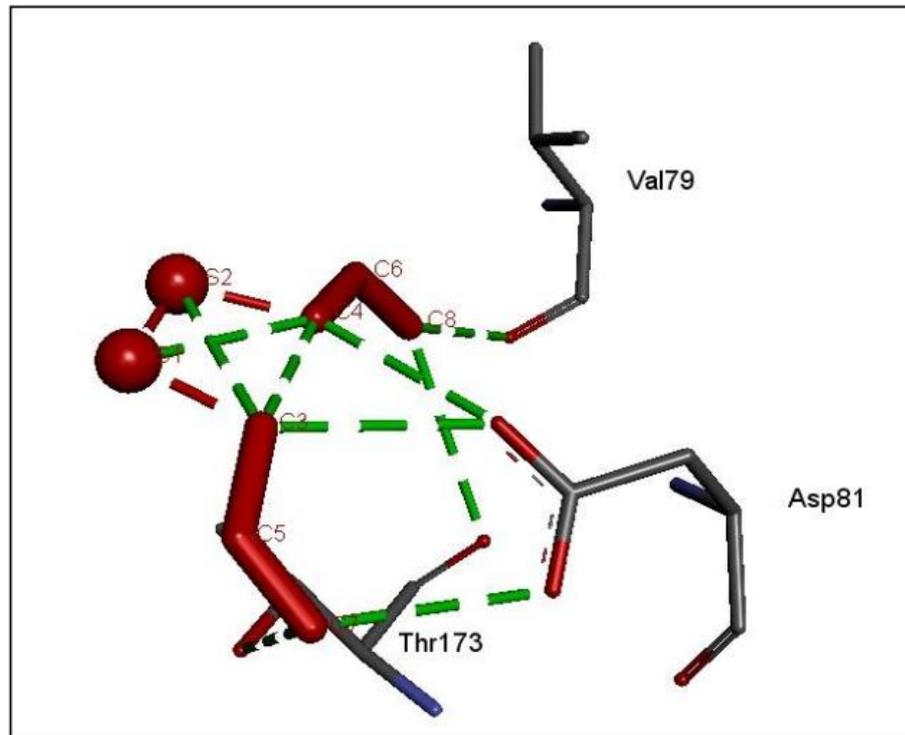
No	Ligan	Konformasi	Skor		Konformasi Terbaik
			<i>Binding Energy</i> (Kkal/mol)	<i>Inhibition Constant</i> (mM)	
1	Dialil disulfida	1	-3,42	3,11	Konformasi 6
		2	-3,42	3,11	
		3	-3,34	3,59	
		4	-3,51	2,68	
		5	-3,21	4,44	
		6	-3,56	2,47	
		7	-3,49	2,75	
		8	-3,51	2,69	
		9	-3,27	3,99	
		10	-3,55	2,51	
2	Dialil trisulfida	1	-3,44	3,03	Konformasi 7
		2	-3,40	2,98	
		3	-3,69	1,97	
		4	-3,77	1,72	
		5	-3,76	1,75	
		6	-3,28	3,94	
		7	-3,83	1,57	

		8	-3,49	2,77	
		9	-3,83	1,56	
		10	-3,47	2,88	
3	Dialil tetrasulfida	1	-3,61	2,27	Konformasi 8
		2	-3,58	2,37	
		3	-3,64	2,16	
		4	-3,69	1,96	
		5	-3,88	1,43	
		6	-3,63	2,17	
		7	-3,63	2,2	
		8	-3,91	1,35	
		9	-3,65	2,11	
		10	-3,7	1,94	
4	<i>Allicin</i>	1	-3,7	1,89	Konformasi 10
		2	-3,98	1,2	
		3	-3,66	2,09	
		4	-3,81	1,62	
		5	-3,9	1,38	
		6	-3,8	1,63	
		7	-3,58	2,39	
		8	-3,84	1,53	
		9	-3,58	2,36	

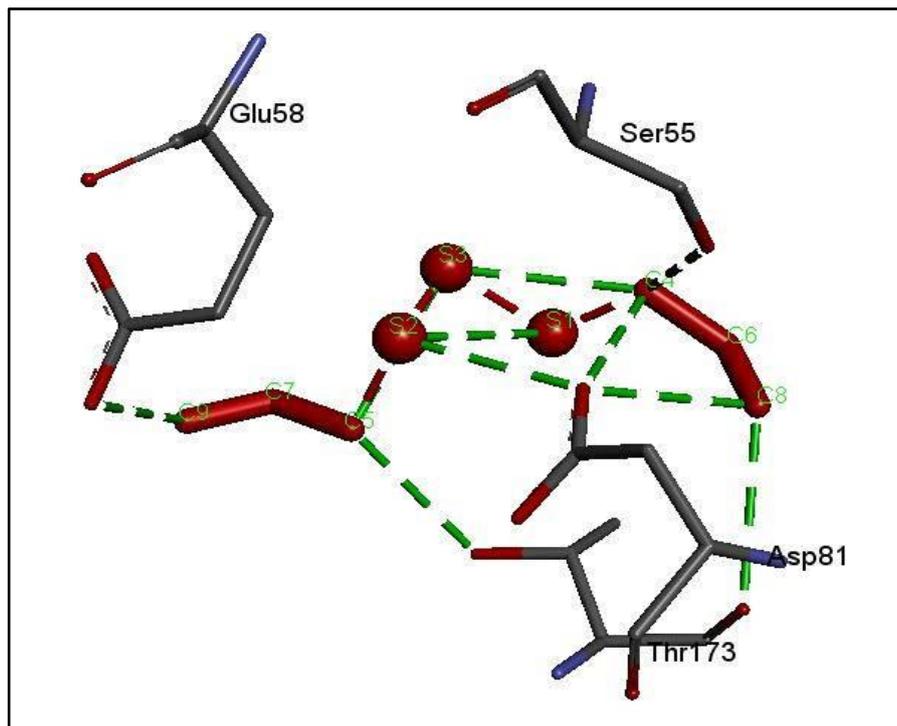
		10	-4,0	1,17	
5	<i>Diethyl mercaptole</i>	1	-3,74	1,83	Konformasi 1
		2	-3,54	2,53	
		3	-3,55	2,49	
		4	-3,71	1,91	
		5	-3,59	2,33	
		6	-3,54	2,54	
		7	-3,62	2,23	
		8	-3,74	1,83	
		9	-3,3	3,84	
		10	-3,58	2,38	
6	<i>2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin</i>	1	-3,94	1,3	Konformasi 9
		2	-3,91	1,36	
		3	-3,91	1,35	
		4	-3,9	1,38	
		5	-3,92	1,34	
		6	-3,85	1,5	
		7	-4,06	1,06	
		8	-3,91	1,37	
		9	-4,07	1,04	
		10	-3,89	1,4	
		1	-5,3	130,41 μM	

7	Siprofloksasin	2	-5,65	71,86 μM	Konformasi 10
		3	-5,72	64,21 μM	
		4	-5,77	58,92 μM	
		5	-5,61	77,89 μM	
		6	-5,03	205,46 μM	
		7	-5,7	66,78 μM	
		8	-5,09	187,16 μM	
		9	-5,7	66,51 μM	
		10	-5,79	56,76 μM	
		8	Ref Ligand	1	
2	-5,42			106,79 μM	
3	-8,15			1,06 μM	
4	-5,47			97,02 μM	
5	-6,17			29,79 μM	
6	-4,58			442,66 μM	
7	-6,05			36,73 μM	
8	-4,38			612,0 μM	
9	-5,73			62,65 μM	
10	-4,74			334,7 μM	

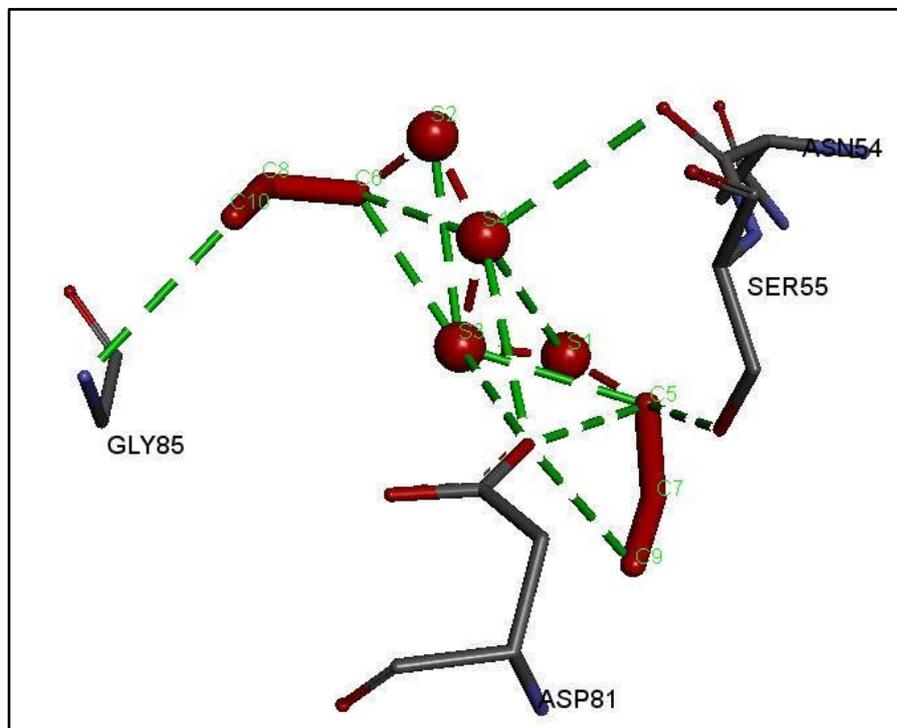
Lampiran 9. Visualisasi 3D Interaksi Antara Dialil disulfida dan DNA gyrase subunit B



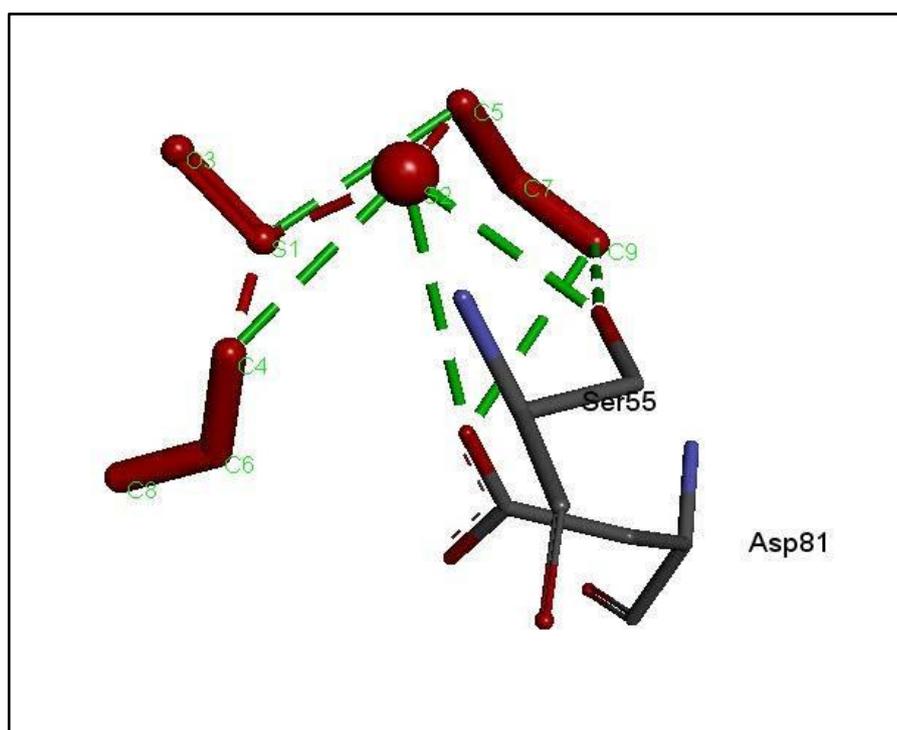
Lampiran 10. Visualisasi 3D Interaksi Antara Dialil trisulfida dan DNA gyrase subunit B



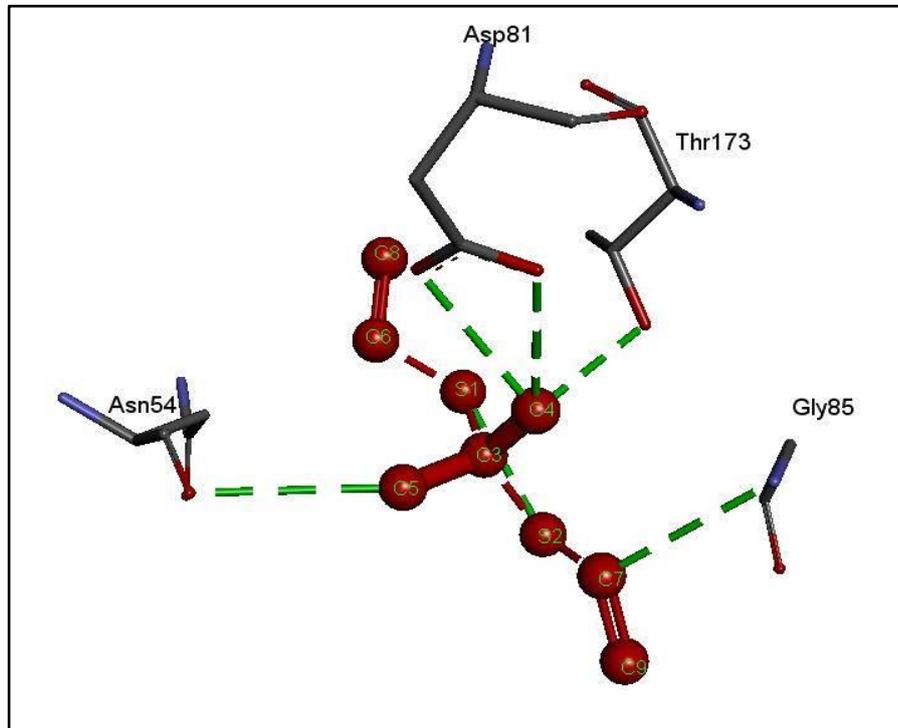
Lampiran 11. Visualisasi 3D Interaksi Antara Dialil tetrasulfida dan DNA gyrase subunit B



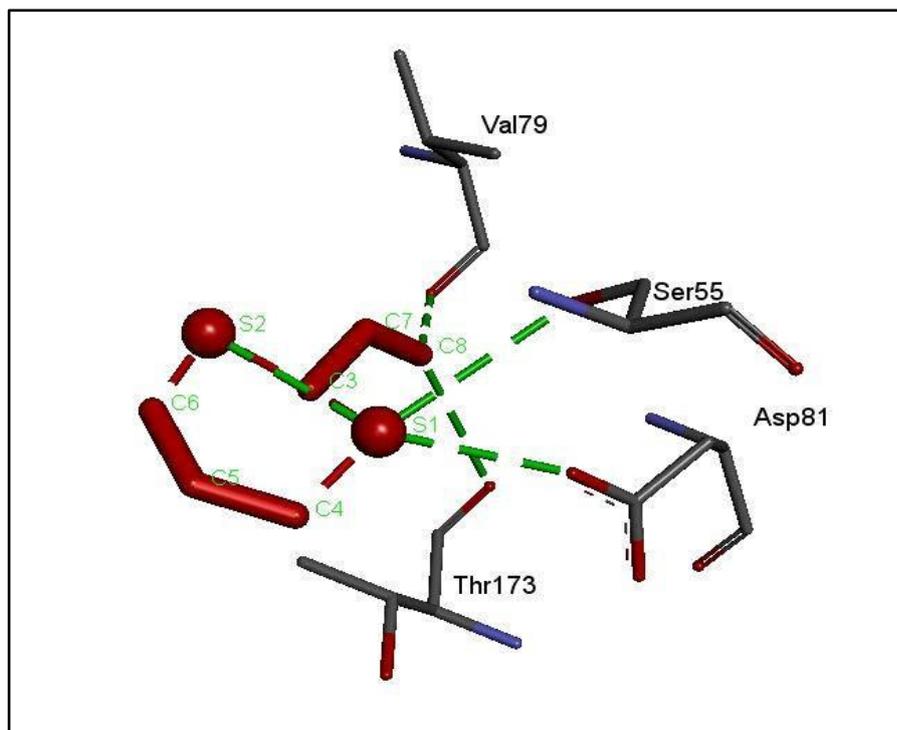
Lampiran 12. Visualisasi 3D Interaksi Antara *Allicin* dan DNA gyrase subunit B



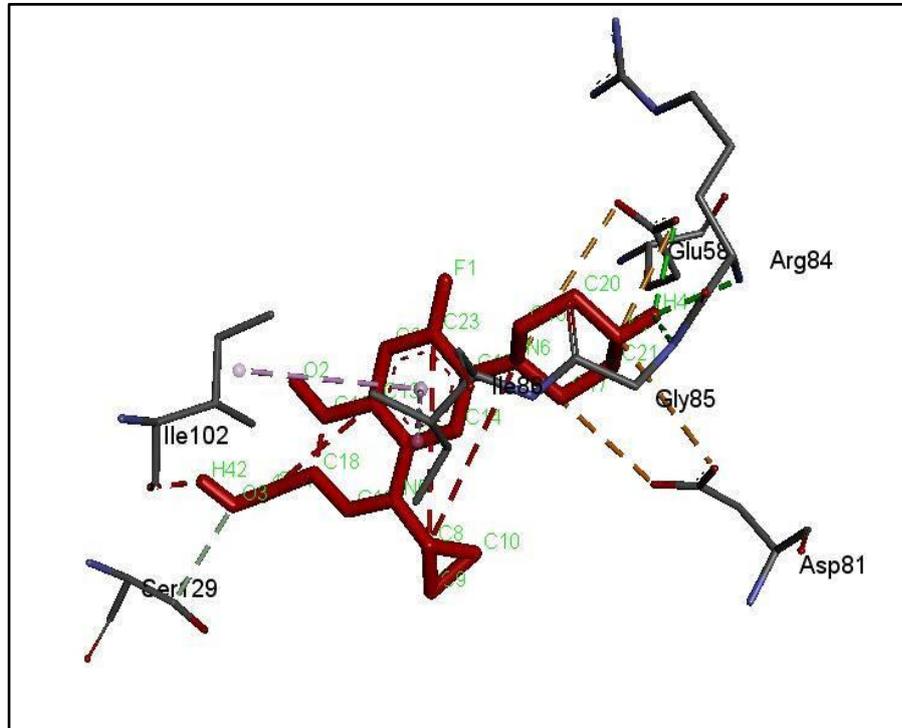
Lampiran 13. Visualisasi 3D Interaksi Antara *Diethyl mercaptole* dan DNA gyrase subunit B



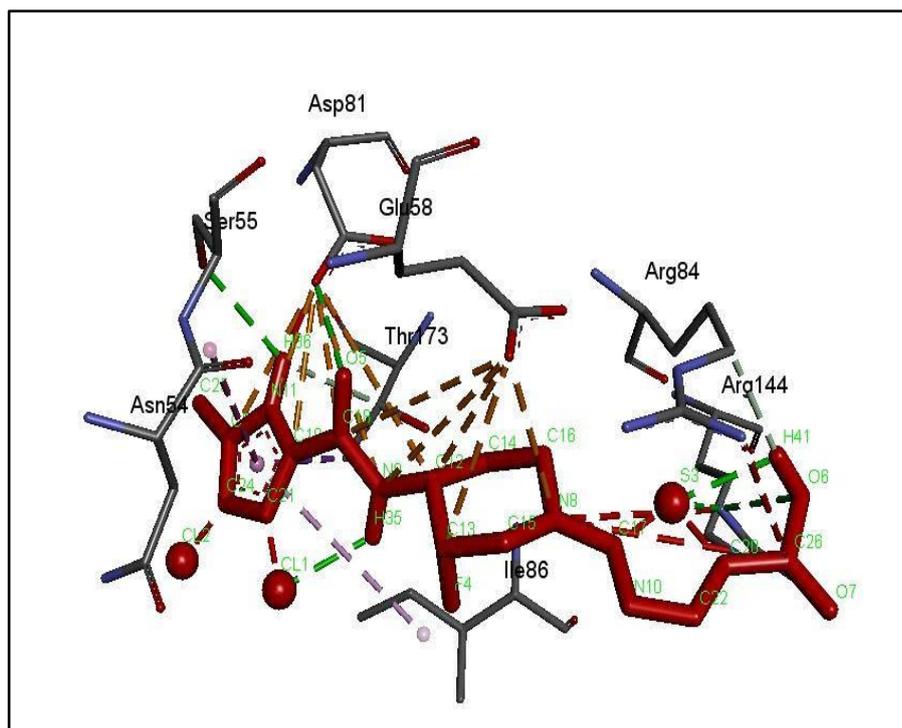
Lampiran 14. Visualisasi 3D Interaksi Antara 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin dan DNA gyrase subunit B



Lampiran 15. Visualisasi 3D Interaksi Antara Siprofloksasin dan DNA gyrase subunit B



Lampiran 16. Visualisasi 3D Interaksi Antara *Ref Ligand* dan DNA gyrase subunit B



Lampiran 17. Foto Hasil Penelitian

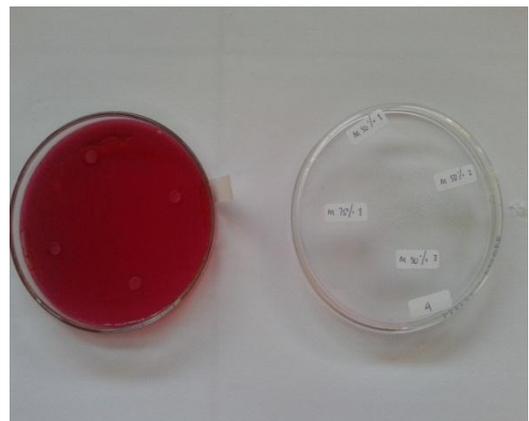
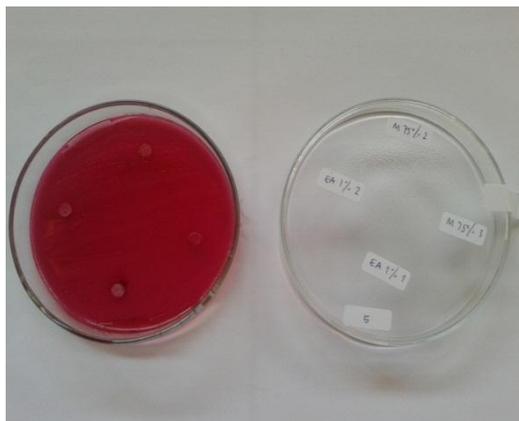


(A)

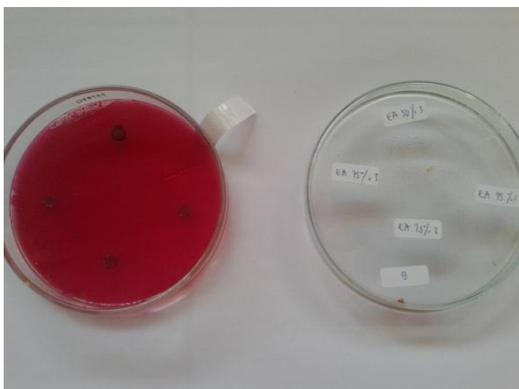


(B)

Gambar 1. Ekstrak Terfraksi (A) dan Variasi Konsentrasi (B)



Gambar 2. Zona hambat pertumbuhan bakteri *E coli* oleh fraksi Metanol



Gambar 3. Zona hambat pertumbuhan bakteri *E coli* oleh fraksi Etilasetat

