

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Disentri Basiler

1. Definisi

Disentri basiler atau Shigellosis merupakan suatu penyakit infeksi akut yang terjadi pada usus yang disebabkan oleh bakteri genus *Shigella* (Bush and Perez., 2014). Secara umum terdapat 4 spesies *Shigella* yang menyebabkan disentri basiler, meliputi *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, dan *Shigella sonnei* (*Infectious Diseases Protocol*, 2009).

Secara umum gejala yang terjadi pada disentri basiler adalah diare, adanya lendir dan darah dalam feses, nyeri perut dan tenesmus (Tjokoprawiro, 2007). Adanya darah dan lendir dalam feses disebabkan karena invasi bakteri *Shigella sp.* pada dinding usus sehingga menyebabkan kerusakan pada dinding usus (*Public Health Agency of Canada*, 2005). Selain itu penyakit ini dikarakterisasi dengan meningkatnya frekuensi buang air besar, sedikitnya volume feses, feses lembek, terdapatnya darah dan lendir dalam feses, demam, serta rasa nyeri (WHO, 2001).

2. Epidemiologi

Disentri basiler terjadi di seluruh dunia dan bertanggung jawab terhadap lebih dari 600.000 kematian setiap tahun, dengan 2/3 kasus kematian muncul pada anak-anak usia dibawah 10 tahun (*Public Health Agency of Canada*, 2005). Penularan penyakit ini umumnya disebabkan karena *person-to-person infection*. Selain itu dapat terjadi melalui makanan atau minuman yang telah

terkontaminasi bakteri *Shigella sp.*, menggunakan air yang tercemar, dan kurangnya higienitas (*Shigellosis Investigation Guidelines*, 2012). Terkait dengan higienitas, disentri basiler terutama terdapat pada negara berkembang dengan kebersihan lingkungan yang kurang dan penghuni padat. Disentri basiler mudah menyebar pada kondisi lingkungan yang jelek (Tjokoprawiro, 2007). Di Amerika, penyebab disentri basiler paling banyak adalah *Shigella sonnei* yang mencapai 75,2% dan kejadian terendah disebabkan oleh *Shigella dysenteriae* yaitu sebesar 0,3% dari jumlah keseluruhan kasus disentri basiler (CDC, 2012). Selain itu, pada tahun 2012 juga dilaporkan bahwa umur rata-rata terjangkit disentri basiler akibat *Shigella sonnei* adalah umur 7 tahun dan angka tersebut relatif sama dari tahun ke tahun (CDC, 2012).

Di Indonesia, dari hasil penelitian yang dilakukan di berbagai rumah sakit dari tahun 1998 sampai dengan 1999, terdapat 3848 penderita diare berat dan 5% disebabkan oleh bakteri *Shigella sp.* (Subekti *et al.*, 2001). Selain itu juga dilaporkan bahwa 29% kematian anak-anak usia 1 hingga 4 tahun yang disebabkan diare adalah akibat disentri basiler (Nafianti dan Sinuhaji, 2005).

3. Etiologi

Disentri basiler atau Shigellosis disebabkan oleh bakteri genus *Shigella*. Bakteri ini termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* dan merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang (basil) (Heymann, 2008). Selain itu bakteri ini bersifat anaerob fakultatif, yang berarti dapat hidup tanpa atau dengan adanya oksigen (Hale and Keusch, 1996).

4. Patogenesis

Shigella sp. ditularkan melalui jalur *fecal-oral* dan masuk dalam tubuh secara per oral melalui makanan atau air yang terkontaminasi (Schroeder and Hilbi, 2008). Bakteri ini akan menjadi penyakit apabila jumlahnya 10 hingga 100 bakteri (Dupont *et al*, 1989). Bakteri ini juga cukup tahan terhadap suasana asam pada lambung sehingga dapat masuk ke dalam usus. Di dalam usus, bakteri berkembang biak dan menyebar dalam lapisan sub mukosa. Bakteri ini dapat berpenetrasi ke mukosa karena bakteri ini secara genetik memiliki “*invasion plasmids*” sehingga menyebabkan kematian sel usus, ulserasi fokal, pengelupasan sel-sel mukosa, lendir disertai darah dalam lumen usus, dan adanya akumulasi sel-sel inflamasi pada lapisan sub mukosa. Selain itu diketahui bahwa *Shigella flexneri* dan *Shigella sonnei* menghasilkan *shiga toxin*. Diduga racun ini berperan dalam merusak sel-sel endotel dari propria lamina sehingga terjadi perubahan mikroangiopati.

5. Pengobatan

Terapi pada kasus ringan umumnya merupakan terapi suportif, yaitu dengan rehidrasi (Bush and Perez., 2014). Hal tersebut dilakukan karena kejadian fatal terbesar kasus disentri basiler disebabkan karena penderita mengalami dehidrasi akibat diare (Ranjbar *et al*, 2010). Untuk kasus yang parah atau pasien dengan respon imun yang rendah biasanya diperlukan antibiotik untuk menurunkan durasi penyakit. Antibiotik yang biasa digunakan untuk penanganan disentri basiler meliputi siprofloksasin, azitromisin, dan ceftriaxon (Bush and Perez., 2014). Untuk penanganan dehidrasi yang biasa

digunakan adalah dengan pemberian terapi cairan secara oral atau intravena sesuai derajat dehidrasi. Obat-obatan anti-diare seperti loperamid kontraindikasi pada kasus disentri basiler karena dapat memperlama penyakit karena bakteri akan semakin lama kontak dengan sel epitel usus sehingga kerusakan sel epitel akan semakin luas. Penggunaan antibiotik dapat menurunkan gejala, namun tidak dianjurkan pada pasien dewasa dengan kasus ringan (Bush *and* Perez, 2014). Beberapa *Shigella* banyak yang dilaporkan resisten terhadap ampisilin, cotrimoksazole, dan tetrasiklin (Bush *and* Perez., 2014).

B. *Shigella Flexneri*

Shigella flexneri merupakan salah satu bakteri penyebab diare dari genus *Shigella*. Morfologi bakteri *Shigella flexneri* dapat dilihat pada Gambar 1. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang (basil) dan bersifat anaerob fakultatif. Secara taksonomi klasifikasi *Shigella flexneri* dapat dilihat dibawah :

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Gammaproteobacteria
 Order : Enterobacteriales
 Family : Enterobacteriaceae
 Genus : *Shigella*
 Species : *Shigella flexneri*
 (Castellani *and* Chalmers, 1919)



Gambar 1. *Shigella flexneri*
 (Sumber : CDC, 2011)

Terdapat 4 spesies *Shigella*, meliputi *Shigella dysenteriae* (Grup A), *Shigella flexneri* (Grup B), *Shigella boydii* (Grup C), dan *Shigella sonnei* (Grup D) (*Shigellosis Investigation Guidelines*, 2012). Selain itu terdapat 4 serotipe dari 4 spesies *Shigella*. *Shigella sonnei* merupakan satu-satunya spesies *Shigella* yang hanya memiliki serotipe tunggal, dan untuk *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, dan *Shigella boydii* masing-masing memiliki 15, 8, dan 19 serotipe (CDC, 2011). Perbedaan antara kelompok dan serotipe bakteri *Shigella* adalah berdasarkan karakteristik biokimia dan properti antigen (CDC, 2011).

C. Bawang putih (*Allium sativum* L.)

Bawang putih merupakan tanaman berbentuk rumput, memiliki daun panjang dan berbentuk pipih yang berjumlah 7 hingga 10 helai per tanaman. Tanaman bawang putih dapat tumbuh subur pada semua jenis tanah yang subur dan gembur serta mengandung bahan organik yang tinggi. Kondisi yang optimal dalam pertumbuhan tanaman bawang putih adalah pada suhu 20° C dan pada pH netral hingga mendekati alkali (6,5 – 7,0). Tempat penanaman tanaman bawang putih yang cocok adalah dataran tinggi antara 700 hingga 1000 m di atas permukaan laut. Umbi tanaman bawang putih berwarna putih dan berlapis-lapis. Sebuah umbi terdiri dari 8 hingga 20 siung. Diantara siung terdapat suatu lapisan kulit tipis sehingga membentuk satu kesatuan. Setiap siung bawang putih mengandung 63% air, 7% protein, 0,2% lemak, 28% karbohidrat, 0,8% serat, dan 1,0% abu (Ashari, 1995). Umbi bawang putih seperti terlihat pada gambar 2.

Secara taksonomi klasifikasi umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) dapat dilihat di bawah :

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Sub Kelas	: Liliadae
Ordo	: Liliales
Famili	: Liliaceae
Genus	: Allium
Spesies	: <i>Allium sativum</i> L. (PLANTAMOR, 2012)



Gambar 2. *Allium sativum* L.
(Sumber : Rignanese, 2005)

Di Mesir, tanaman ini sudah dikenal sejak 2500-3000 tahun SM. Kemudian pelaut Spanyol dan Portugis menyebarkan ke Eropa barat. Konsumsi bawang putih menempati posisi kedua setelah bawang bombai. Bawang putih ini umumnya digunakan sebagai bumbu masakan dan sebagian kecil digunakan untuk obat-obatan (Ashari, 1995).

Bawang putih digunakan untuk pengobatan kira-kira 5000 tahun yang lalu dan telah digunakan kira-kira 3000 tahun sebagai *Chinesse Medicine*. Bangsa Mesir, Babylonia, Yunani, dan Romawi juga telah menggunakan bawang putih ini untuk penyembuhan. Saat ini bawang putih digunakan untuk membantu menurunkan kolesterol, pada penyakit kardiovaskuler, antikanker, dan sebagai antimikroba (Koch and Lawson, 1996).

Secara umum, bawang putih mengandung senyawa-senyawa organosulfur seperti allicin, dialil disulfida, S-alilsistein, dan dialil trisulfida (Mikaili *et al*, 2013). Senyawa yang diduga berperan sebagai antibakteri adalah senyawa-

senyawa Thiosulfinates, misalnya adalah allicin (Hughes *and* Lawson, 1991). Allicin akan terbentuk ketika alliin [(+)-(S)-allyl-L-cysteine-sulfoxide] secara enzimatis dirubah oleh enzim alliinase ketika bawang putih dicincang, dihancurkan, maupun dikunyah. Namun enzim alliinase ini aktivitasnya akan berkurang ketika kontak dengan asam lambung maupun oleh panas (Tattelman, 2005). Pada suhu ruangan, perubahan enzimatik terjadi pada waktu 10 hingga 15 menit. 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 *ammonia*. *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).

Mekanisme antibakteri senyawa allicin diduga dengan menghambat sintesis RNA secara total, dan menghambat sintesis DNA dan protein secara parsial (Feldberg *et al.*, 1988). 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).

D. Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan untuk memisahkan senyawa aktif dari campurannya dengan menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang sesuai

dan dengan prosedur ekstraksi tertentu. Ekstraksi ini merupakan hal yang krusial dalam pengujian maupun formulasi tanaman. Tujuan ekstraksi ini 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, 1987). Hal tersebut disebabkan karena pengeringan dapat menurunkan kadar air sehingga menurunkan reaksi enzimatik, namun dalam proses pengeringan harus tetap diawasi untuk mencegah terjadinya perubahan kimia yang berlebihan (Harborne, 1987). Pembuatan dalam bentuk serbuk dimaksudkan untuk memperluas permukaan sehingga meningkatkan kontak dengan cairan penyari. Secara umum prinsip ekstraksi adalah pengikatan atau pelarutan zat yang diinginkan dalam suatu simplisia berdasarkan sifat kelarutannya dengan suatu pelarut (*like-dissolve-like*). Pengeringan bahan akan menguapkan air dalam simplisia sehingga serbuk simplisia akan timbul suatu pori-pori. Pelarut kemudian mengisi pori-pori tersebut sehingga pelarut akan kontak dengan zat aktif dalam tanaman sehingga zat-zat aktif tersebut akan melarutkan isi sel karena perbedaan konsentrasi dalam sel dan di luar sel. Zat aktif yang sudah terlarut kemudian akan keluar sel secara difusi. Proses difusi akan berkurang apabila konsentrasi pelarut mencapai kesetimbangan antara dalam sel dan di luar sel.

Metode dalam ekstraksi umumnya dibedakan menjadi 2, yaitu dengan cara panas dan cara dingin. Metode cara panas misalnya adalah refluks, soxhletasi,

digesti, infus, dan dekok. Sedangkan cara dingin meliputi maserasi dan perkolasi (Ditjen POM, 2000). Dalam hal ini metode maserasi adalah metode yang paling sering digunakan karena dianggap lebih mudah dan sederhana meskipun diperlukan waktu yang cukup lama dan membutuhkan cairan penyari yang lebih banyak.

E. Maserasi

Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (Ditjen POM, 2000). Pada dasarnya maserasi merupakan cara penyarian yang mudah dan sederhana yaitu dengan merendam serbuk simplisia dengan suatu pelarut tertentu dalam suatu jangka waktu tertentu. 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). Proses ini dilakukan selama 5 hari dan dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari. Selama maserasi dilakukan pengadukan atau pengocokan berulang.

Proses perendaman serbuk simplisia dengan suatu pelarut ini akan menyebabkan pelarut masuk ke dalam sel melalui dinding sel sehingga isi sel akan larut karena perbedaan konsentrasi antara di dalam sel dan di luar sel. Isi sel yang merupakan kumpulan senyawa akan keluar sel secara difusi. Peristiwa ini

akan berlangsung terus menerus hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara di dalam sel dan di luar sel.

F. Ekstraksi Cair-cair

Ekstrak yang diperoleh melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut organik masih mengandung zat-zat pengotor seperti karbohidrat, lilin, resin, dan sejenisnya. Keberadaan zat-zat tersebut lebih banyak merugikan pada kestabilan dan mengurangi kadar senyawa aktif di dalam ekstrak, sehingga zat-zat pengotor tersebut harus dihilangkan (Srijanto dkk, 2012). Untuk menghilangkan zat-zat pengotor tersebut maka diperlukan fraksinasi ekstrak. Fraksinasi ekstrak diharapkan mampu meningkatkan khasiat ekstrak dan memperkecil jumlah dosis pemberian kepada pengguna (Srijanto dkk, 2012). Salah satu teknik fraksinasi ekstrak adalah teknik ekstraksi cair-cair.

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 zat terlarut tersebut dilakukan didalam dua macam pelarut yang tidak saling campur. Hal tersebut memungkinkan karena adanya sifat senyawa yang dapat terlarut dalam air maupun senyawa yang dapat larut dalam pelarut organik. Komponen kimia yang akan terpisah ke dalam dua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya masing-masing (Harborne, 1987).

G. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

GC-MS merupakan suatu teknik analisis yang terdiri dari 2 instrumen, yaitu Kromatografi Gas (GC) dan Spektrometer Massa (MS).

Kromatografi gas merupakan teknik pemisahan fisik berbagai komponen atau campuran yang dipisahkan menggunakan fase gerak yang berupa gas pembawa inert dan fase diam padat (*Gas Solid Chromatography/ GSC*) atau cairan (*Gas Liquid Chromatography/ GLC*) pada suatu kolom kromatografi (Kupiec, 2004). GC mulai dikembangkan dengan teknik yang canggih sejak dirintis oleh Martin dan Synge pada tahun 1952 dan telah digunakan untuk memisahkan campuran sampel yang kompleks yang bersifat mudah menguap (Crawford Scientific, 2015). GC menggunakan gas pembawa (*carrier gas*) sebagai fase gerak untuk membawa sampel melewati kolom yang mengandung fase diam. Fase gerak yang dapat digunakan adalah gas Helium karena gas ini bersifat inert. 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 antara 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 di bawa 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). Senyawa yang tidak berinteraksi akan melewati kolom dengan lebih cepat (Douglas, 2015). Waktu yang diperlukan suatu senyawa hasil pemisahan untuk melewati kolom disebut dengan waktu retensi (*retention time/*

Rt) sehingga faktor ini dapat menjadi pembeda untuk berbagai senyawa hasil pemisahan sampel (Douglas, 2015).

Spektrometer Massa (MS) adalah suatu teknik analisis yang digunakan untuk identifikasi suatu elemen yang belum diketahui dan untuk mengetahui struktur molekul (Van Bramer, 1998). Instrumen ini digunakan untuk analisis berbagai macam substansi kimia, *trace metals*, dan materi biologi [Japan Electron Optics Laboratory (JEOL), 2006]. MS bekerja dengan membentuk suatu muatan partikel/ ion yang berasal dari substansi kimia yang akan dianalisis yang selanjutnya dilakukan penetapan massa partikel yang telah bermuatan oleh medan magnet (JEOL, 2006). Secara umum komponen instrumen MS meliputi ruang ionisasi, *mass analyzer*, dan detektor (JEOL, 2006). Senyawa yang telah terpisah dari instrumen GC selanjutnya menuju ke ruang ionisasi dari instrumen MS dan dilakukan ionisasi sehingga molekul menjadi bentuk terion. Metode ionisasi dalam MS dibedakan menjadi *electron impact* (EI) dan *chemical ionization* (CI) (Crawford Scientific, 2015). Komponen selanjutnya adalah *mass analyzer* (filter). Dalam komponen ini mengandung medan magnet yang berfungsi untuk memisahkan ion-ion berdasarkan momentum mereka. Komponen ini memisahkan ion muatan positif berdasarkan massa yang bergantung pada penggunaan analisis (Bull, 2008). Ion tersebut dideteksi oleh detektor dan menghasilkan output berupa sinyal yang dapat dibaca. 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. Detektor ini

menghasilkan informasi pada komputer berupa data penampilan visual. Selain itu komputer juga mengatur operasi dari instrumen MS (Bull, 2008).

Kromatografi Gas-Spektrometri massa (GC-MS) adalah suatu teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan kromatografi gas dengan detektor berupa spektrometer massa.

H. Zat Antibakteri

Zat antibakteri merupakan suatu senyawa yang berasal dari alam baik sintesis maupun semi-sintesis yang pada konsentrasi rendah dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme tanpa merusak host (WHO, 2000). Zat antibakteri yang disebut juga dengan antibiotik digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri pada manusia maupun pada hewan (WHO, 2011).

Zat antibakteri umumnya memiliki dua mekanisme secara umum, yaitu bakterisida dan bakteristatik (Rao, 2012). Zat antibakteri yang memiliki sifat menghambat multiplikasi bakteri disebut dengan bakteristatik (Irianto, 2006). Sedangkan zat antibakteri yang dapat membunuh atau memusnahkan bakteri disebut dengan bakterisida (Irianto, 2006).

Antibiotik sempat dianggap sebagai “*miracle drugs*” ketika mereka pertama kali diperkenalkan setengah abad yang lalu. Namun pada dekade terakhir, antibiotik mulai kehilangan efektivitas pada bakteri patogen karena banyak terjadi resistensi (Saleem *et al.*, 2009).

Banyak produk herbal yang memiliki efek sebagai agen antibakteri dan digunakan sebagai pengobatan tradisional. Ratusan bahan herbal telah diketahui digunakan untuk berbagai penyakit akibat infeksi. Beberapa nama yang telah

digunakan untuk penyakit infeksi meliputi akasia, bawang putih, kunyit, jahe, cengkeh, dan buah delima (Singh *and* Pandeya, 2011).

I. Uji Sensitivitas Zat Antibakteri

Uji sensitivitas antibakteri digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu zat antibakteri dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan suatu bakteri patogen pada konsentrasi tertentu [*Food and Drug Administration* (FDA), 2009]. Secara umum tujuan tes sensitivitas antibakteri adalah untuk menentukan respon suatu bakteri patogen tertentu terhadap terapi antibakteri pada organisme yang terinfeksi. Selain itu tes ini juga digunakan untuk menentukan zat antibakteri yang sensitif terhadap suatu bakteri tertentu (Street *and* Schmidt, 2014). Hasil yang diperoleh dari tes sensitivitas antibakteri umumnya dikategorikan sebagai “*susceptible*”, “*intermediate*”, atau “*resistant*” terhadap zat antibakteri yang diuji (FDA, 2009).

Tes sensitivitas antibakteri dibagi menjadi beberapa tipe berdasarkan prinsip kerjanya, meliputi :

1. Difusi : *Kirby-Bauer method* dan *Stokes method*
2. Dilusi : *Broth dilution* dan *Agar dilution*
3. Difusi & Dilusi : *E-Test method* (Lalitha, 2004)

Metode Difusi merupakan metode yang paling banyak digunakan laboratorium (Lalitha, 2004). Metode ini merupakan tes yang fleksibel dengan biaya yang terjangkau (Jorgensen *and* Ferraro, 2009).

J. Metode Kirby-Bauer

Metode Kirby-Bauer adalah metode yang digunakan untuk menguji sensitivitas suatu senyawa antibakteri terhadap mikroorganisme patogen aerob maupun anaerob fakultatif penyebab penyakit (Hudzicki, 2013). Metode ini disebut juga dengan *Disc Diffusion Test*, dipublikasi mulai tahun 1950 oleh W. Kirby dan A. Bauer dan kemudian dibakukan oleh WHO pada 1961.

Metode ini digunakan cakram kertas untuk menempatkan zat antibakteri. Sedangkan media agar yang diletakkan pada cawan petri berfungsi untuk menginokulasi bakteri patogen yang akan diuji. Ketika cakram kertas yang telah berisi senyawa antibakteri ditempatkan pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri, senyawa antibakteri mulai berdifusi ke dalam media sekitarnya. Tingkat difusi senyawa antibakteri ini bergantung pada kelarutan dalam agar dan berat molekul senyawa antibakteri. Senyawa yang memiliki kelarutan tinggi akan lebih mudah berdifusi dalam media agar. Sedangkan molekul senyawa antibakteri yang lebih besar akan berdifusi lebih lambat. Pertumbuhan bakteri akan terhambat oleh senyawa antibakteri secara radial disekitar cakram kertas. Konsentrasi senyawa antibakteri di margin ini disebut dengan konsentrasi kritis.

Sensitivitas senyawa antibakteri terhadap mikroorganisme dapat dilihat melalui zona bening yang terbentuk dan diinterpretasikan sebagai DZI. Diameter hambatan yang terbentuk kemudian dibandingkan dengan menggunakan standar. Standar yang biasa digunakan untuk interpretasi DZI adalah dari *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) : Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing*. Namun standar tersebut hanya memuat interpretasi

senyawa antibiotik yang biasa digunakan secara klinik dan belum memuat standar interpretasi untuk bahan herbal.

K. Penambatan Molekul/ *Molecular Docking*

Proses penemuan, pengembangan, dan penelitian obat dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode seperti *in vivo*, *in vitro*, dan *in silico*. Penelitian dengan metode *in silico* merupakan salah satu metode secara komputasi yang menjadi subyek penelitian intensif selama dekade terakhir (Teodoro *et al*, 2001). Penelitian secara *in silico* ini dapat dilakukan dengan penambatan molekul atau *molecular docking*.

Molecular docking merupakan suatu metode yang berfungsi untuk memprediksi aktivitas struktur kimia senyawa atau ligan dengan kompleks protein secara *in silico* atau *virtual screening* (Kroemer, 2007). Selain itu *molecular docking* juga berfungsi untuk meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi target aksinya pada uji secara *in vitro* (Motiejunas *and* 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. Data mengenai protein target dapat diperoleh melalui RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*) berupa kumpulan data yang berisi struktur 3 dimensi molekul kompleks yang telah dipublikasikan.

Molecular docking dapat digunakan untuk pengembangan obat baru karena dinilai lebih cepat, reliabel, serta lebih murah [Schneider *and* Bohm (2002), Waszkowycz *et al* (2001)]. Protokol dalam *docking* merupakan gabungan antara

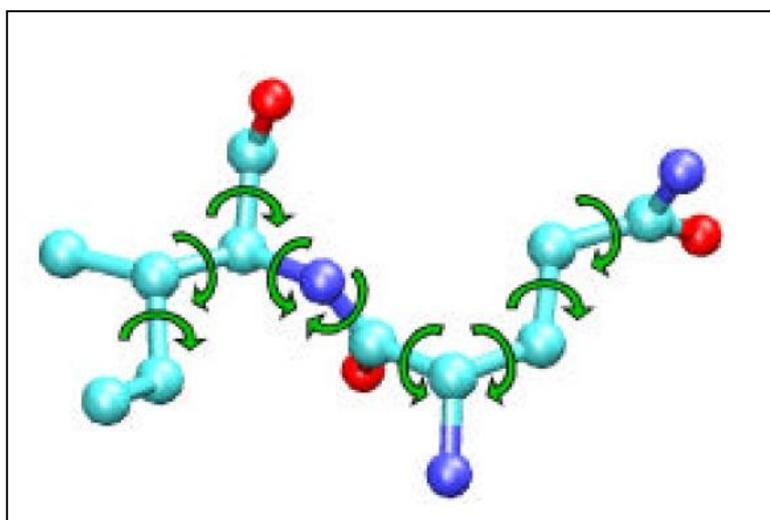
fungsi *search algorithm* dan fungsi *scoring* (Sousa *et al*, 2006). *Search algorithm* harus memungkinkan suatu derajat kebebasan (*degrees of freedom*) dari ikatan antara ligan dan protein untuk dilakukan sampling yang cukup meliputi model terikat yang benar. Sedangkan fungsi *scoring* merupakan persyaratan 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).

Penggunaan *molecular docking* ini dalam aplikasinya digunakan untuk mendapatkan nilai energi ikatan konformasi yang paling rendah dengan afinitas yang paling tinggi (Kroemer, 2007). Prinsip dari *molecular docking* ini umumnya adalah untuk mengetahui ikatan suatu molekul (ligan) dengan suatu protein (reseptor) sehingga dapat digunakan untuk gambaran secara kasar untuk memprediksi aktivitas suatu molekul (ligan). Aplikasi yang dapat digunakan untuk *molecular docking* seperti DOCK, GOLD, FlexX, ICM, AutoDockTools, dll. Aplikasi yang sering digunakan untuk *molecular docking* salah satunya adalah AutoDockTools.

L. AutoDockTools

AutoDockTools merupakan salah satu aplikasi untuk *molecular docking* yang bersifat non komersial. Aplikasi ini banyak digunakan (Rizvi *et al*, 2013) dan sangat bermanfaat dalam memprediksi ikatan antara ligan dan suatu target biomakromolekuler (Morris *et al*, 2012). Salah satu keberhasilan penggunaan AutoDockTools dalam penelitian dan pengembangan obat adalah dalam penemuan obat raltegravir sebagai inhibitor HIV integrase (Norgan *et al*, 2011).

AutodockTools merupakan salah satu aplikasi *molecular docking* yang menggunakan model kinematik. Hal tersebut berjalan ketika proses *docking* dimana suatu ligan secara acak mulai proses pencarian untuk tempat ikatan dan mengeksplorasi untuk mendapatkan nilai translasi, rotasi, serta *internal degrees of freedom* sehingga akan menghasilkan konformasi terikat (Teodoro *et al*, 2001). Model kinematik dari aplikasi AutoDockTools disajikan dalam Gambar 3.



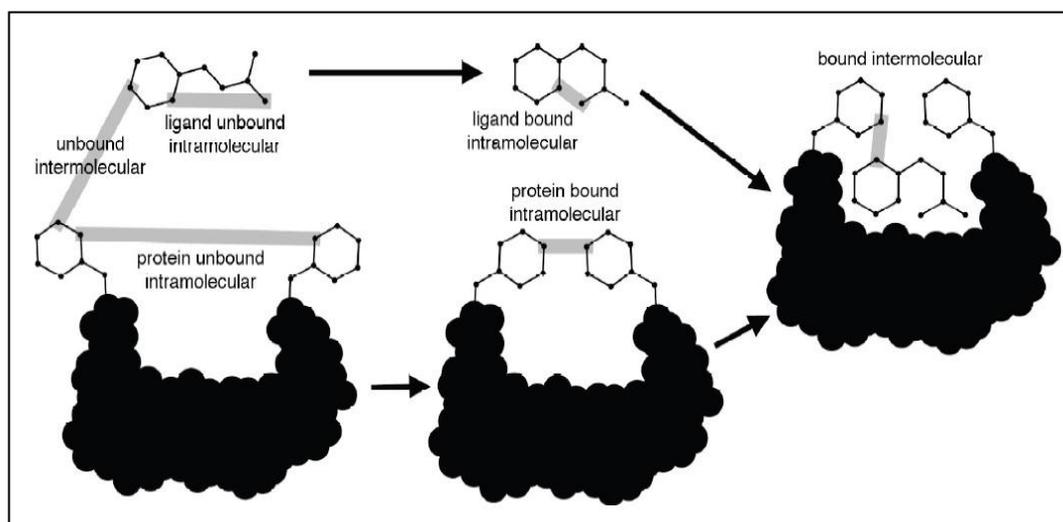
Gambar 3. Model Kinematik AutoDockTools
(Sumber : Teodoro *et al*, 2001)

Petunjuk berupa panah dalam gambar tersebut menunjukkan *rotatable degrees of freedom* dalam ikatan.

AutoDockTools menggunakan metode *stochastic Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) untuk mencari konformasi ligan secara komputasi dan sekaligus meminimalkan fungsi *scoring* sehingga mendekati stabilitas secara termodinamik antara ligan dan protein target (Morris *et al*, 2012). Untuk eksperimen *docking*, aplikasi ini dapat memasukkan koordinat ligan dan makromolekul serta

memanfaatkan LGA untuk menghasilkan posisi ligan dan meminimalkan energi ikatan.

AutoDockTools menggunakan energi bebas medan gaya (*force field*) secara semi empiris untuk mengevaluasi setiap konformasi selama simulasi *docking* berlangsung (Morris *et al*, 2012). Pada awalnya ligan dan protein target dalam keadaan tidak terikat. Evaluasi terhadap medan gaya dilakukan dalam dua langkah. Langkah yang pertama dilakukan dengan memperkirakan energi intramolekuler terhadap transisi dari posisi tidak terikat menjadi konformasi terikat. Selanjutnya pada langkah yang kedua dilakukan evaluasi terhadap energi intermolekuler dari ikatan antara ligan dan protein target terhadap konformasi terikatnya (Morris *et al*, 2012). Ikatan diantara ligan dan protein untuk mengestimasi medan gaya saat simulasi *docking* berlangsung ditunjukkan dalam Gambar 4.



Gambar 4. Ikatan diantara ligan dan protein untuk memperkirakan medan gaya (*force field*)

(Sumber : Morris *et al*, 2012)

Medan gaya (ΔG) merupakan kombinasi antara evaluasi 6 pasangan (V) dan perkiraan entropi konformasi yang hilang setelah kondisi terikat (ΔS_{conf}) (Morris *et al*, 2012). Medan gaya tersebut dikalkulasi melalui Persamaan 1.

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{P-L} - V_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

Persamaan 1. Kalkulasi medan gaya (*force field*)

Tanda “L” menunjukkan ligan, sedangkan “P” menunjukkan protein pada kalkulasi *docking* antara ligan dan protein. Energi berpasangan (*pair-wise*) yang dimaksud dalam persamaan tersebut meliputi evaluasi terhadap dispersi atau tolakan, ikatan hidrogen, elektrostatik, dan desolvasi (Morris *et al*, 2012).

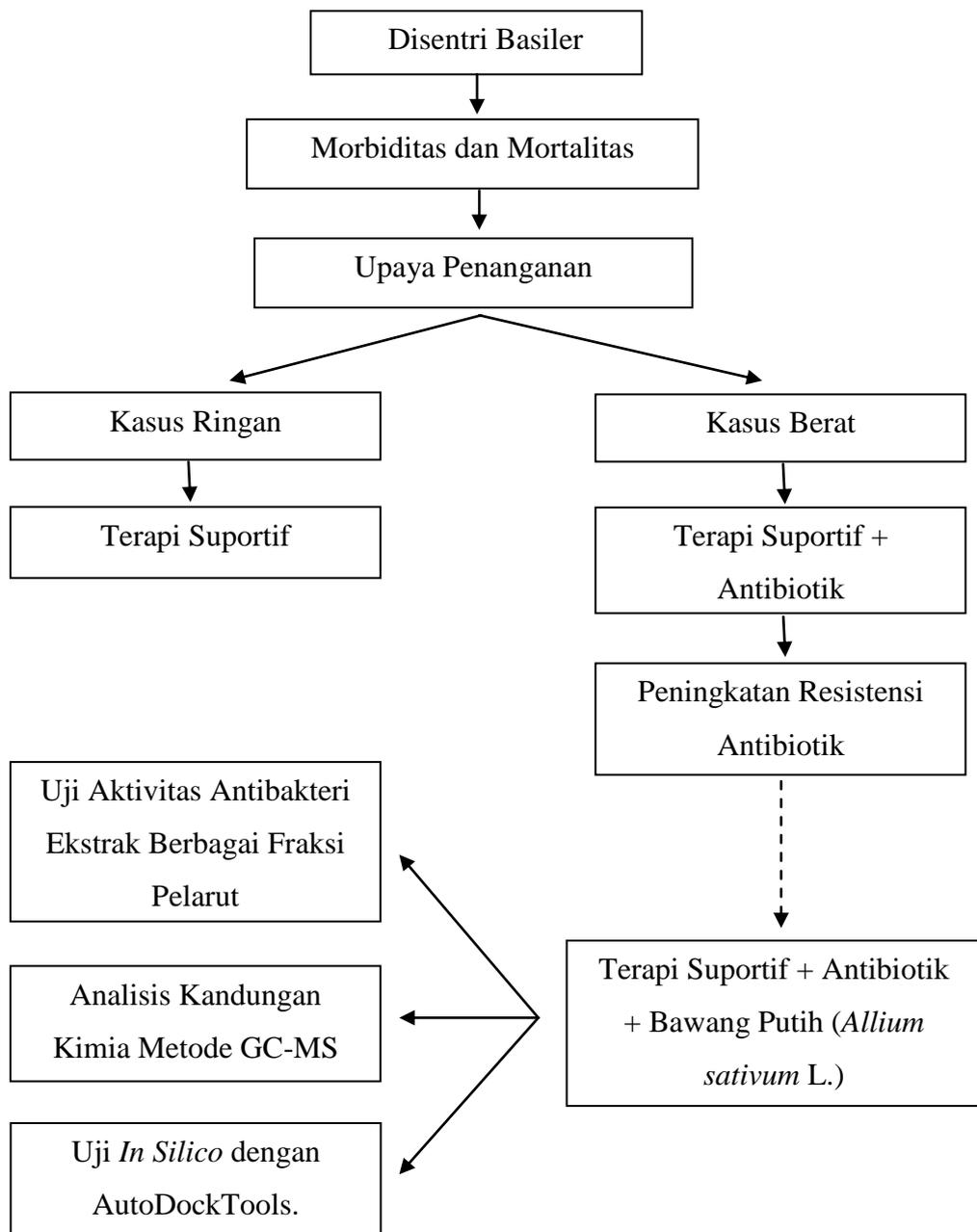
Hasil dari AutodockTools ini adalah berupa skor energi interaksi untuk menentukan konformasi yang baik maupun yang buruk. Skor *docking* tersebut diestimasi sebagai harga ΔG atau *binding energy* yang memiliki satuan dalam kkal/mol. Konformasi yang baik diketahui dengan melihat hasil *docking* yang memiliki energi interaksi yang kecil pada ikatan antara ligan dan protein target (Morris *et al*, 2012).

Kerangka Konsep

Disentri basiler merupakan suatu penyakit infeksi akut yang terjadi pada usus yang disebabkan oleh bakteri genus *Shigella* (Bush and Perez, 2014). Disentri basiler merupakan salah satu penyakit yang masih menimbulkan morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia. Angka kematian akibat disentri basiler di seluruh dunia mencapai lebih dari 600.000 kasus dengan 2/3 kasus terjadi pada anak-anak usia dibawah 10 tahun (*Public Health Agency of Canada, 2005*).

Pengobatan utama pada disentri basiler adalah rehidrasi. Hal tersebut dilakukan karena kejadian fatal terbesar kasus disentri basiler disebabkan karena penderita mengalami dehidrasi akibat diare (Ranjbar *et al*, 2010). Pada kasus yang lebih berat biasanya diperlukan antibiotik untuk menurunkan durasi penyakit.

Banyaknya laporan terjadinya resistensi antibiotik, misalnya pada ampisilin, kotrimoksazol, dan tetrasiklin (Bush and Perez., 2014) akan meningkatkan masalah tentang pengobatan disentri basiler. Untuk mengurangi hal tersebut, maka diperlukan suatu terapi komplementer atau penambahan 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). Khasiat antibakteri bawang putih diduga diperankan oleh adanya senyawa-senyawa thiosulfinat, misalnya allicin (Hughes and Lawson, 1991). Skema mengenai kerangka konsep dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Kerangka Konsep

Hipotesis

Dari penelitian ini, dirumuskan hipotesis bahwa :

1. Fraksi semi polar dan non polar memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri*.
2. Fraksi ekstrak yang terbukti signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* memiliki kandungan senyawa organosulfur.
3. Berdasarkan analisis secara *molecular docking*, senyawa-senyawa organosulfur memiliki afinitas dalam menghambat protein DNA gyrase subunit B.