

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil Penelitian**

##### **1. Identifikasi Tanaman**

Hasil identifikasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada menyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) dari suku Amaryllidaceae (Lampiran 2).

##### **2. Pembuatan Ekstrak Etanolik**

Umbi bawang putih sebanyak 32 kg yang telah dibersihkan dari kulit ari dan pengotornya selanjutnya dicuci dengan air bersih dan dirajang tipis. Kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam hingga kering. Simplisia yang telah kering selanjutnya diblender hingga menjadi serbuk untuk meningkatkan luas permukaan bahan baku. Hasil dari proses ini diperoleh serbuk simplisia sebanyak 10 kg. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:5 b/v selama 24 jam. Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak kental etanolik sebanyak 2,3 kg berwarna coklat tua dengan bau khas bawang putih.

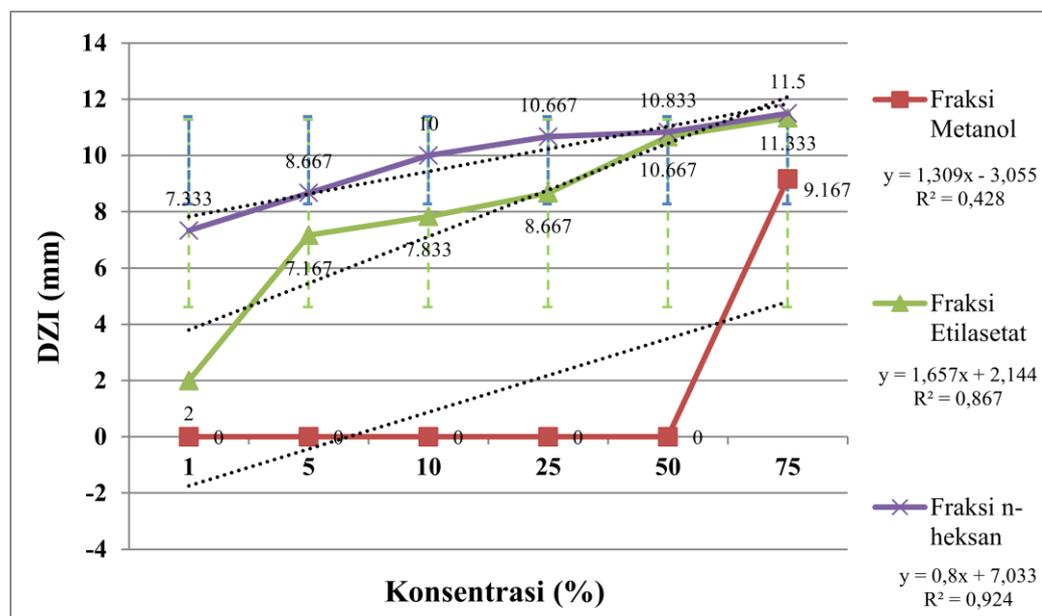
##### **3. Pembuatan Fraksi Ekstrak**

Pembuatan fraksi ekstrak dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (*liquid extraction*) dengan menggunakan pelarut metanol, etilasetat, dan n-heksan. Ekstraksi cair-cair dilakukan pada 600 gram ekstrak kental etanolik

untuk masing-masing pelarut. Hasil ekstraksi ini diperoleh fraksi metanol sebanyak 219,17 gram berwarna coklat tua, fraksi etilasetat sebanyak 2,47 gram berwarna coklat, dan fraksi n-heksan sebanyak 2,33 gram berwarna coklat kekuningan.

#### 4. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan pada fraksi metanol, etilasetat, dan n-heksan terhadap media yang telah diinokulasi dengan bakteri *Shigella flexneri*. Masing-masing fraksi ekstrak tersebut dibuat variasi konsentrasi 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, dan 75%. Masing-masing variasi konsentrasi dari setiap fraksi ekstrak tersebut dilakukan replikasi pengujian sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh dari pengujian ini adalah nilai DZI yang menggambarkan kemampuan sampel untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Hasil pengujian ini dinyatakan dalam Gambar 8.



**Gambar 8.** Kurva hubungan konsentrasi ekstrak fraksi metanol, etilasetat, dan n-heksan terhadap inhibisi pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*

Berdasarkan Gambar 8 diketahui bahwa fraksi metanol pada konsentrasi 1%, 5%, 10%, 25%, dan 50% tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri fraksi metanol mulai terlihat pada konsentrasi 75% sehingga dapat disimpulkan bahwa KHM fraksi metanol berada pada konsentrasi 75%. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi metanol juga dapat dilihat pada Lampiran 4.

Data hasil pengujian terhadap fraksi etilasetat (Lampiran 5) pada konsentrasi 1% menunjukkan zona hambat pada replikasi kedua, sedangkan pada replikasi pertama dan ketiga tidak menunjukkan zona hambat. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1% belum menunjukkan KHM yang sesungguhnya. Aktivitas antibakteri fraksi etilasetat yang sesungguhnya terlihat pada konsentrasi 5% dimana pada ketiga replikasi menunjukkan nilai hambatan. Dari hal ini disimpulkan bahwa nilai KHM fraksi etilasetat berada pada konsentrasi 5%.

Hasil pengujian terhadap fraksi n-heksan (Lampiran 6) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1% sudah menunjukkan zona hambat terhadap bakteri *Shigella flexneri*, sehingga nilai KHM fraksi n-heksan berada pada konsentrasi 1%. Dari hasil ini diketahui bahwa fraksi n-heksan lebih poten dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* apabila dibandingkan dengan fraksi metanol dan fraksi etilasetat.

Hasil pengujian tersebut selanjutnya dibandingkan dengan larutan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif digunakan larutan siprofloksasin 5 µg, sedangkan kontrol negatif digunakan aquadest steril dan

campuran aquadest dan span 80. Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dan dinyatakan dalam Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil uji aktivitas antibakteri kontrol positif (siprofloksasin 5 $\mu$ g) dan kontrol negatif (aquadest steril dan aquadest steril + span 80) terhadap inhibisi pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*

| Jenis       | DZI (mm)                    |                 |                              |
|-------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|
|             | Siprofloksasin<br>5 $\mu$ g | Aquadest steril | Aquadest steril<br>+ span 80 |
| Replikasi 1 | 30                          | 0               | 0                            |
| Replikasi 2 | 29                          | 0               | 0                            |
| Replikasi 3 | 30                          | 0               | 0                            |
| Rata – rata | 29,667                      | 0               | 0                            |

Data hasil pengujian antibakteri dari masing-masing fraksi ekstrak, kontrol positif, dan kontrol negatif selanjutnya dilakukan analisis untuk mengetahui pengaruh diantara ketiga kelompok sampel tersebut dan untuk mengetahui fraksi ekstrak yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*.

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 dengan siprofloksasin sebagai kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*, sedangkan kedua kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat. Berdasarkan hasil pengamatan diketahui bahwa kemampuan penghambatan masing-masing fraksi lebih lemah apabila dibandingkan dengan siprofloksasin.

Nilai DZI yang diperoleh dari ketiga fraksi tersebut dilakukan analisis deskriptif dan parametrik dengan uji *one way* ANOVA berguna untuk mengetahui perbedaan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Analisis deskriptif bertujuan untuk mengetahui rata-rata dari ketiga fraksi yang memiliki DZI terbesar. Hasil dari analisis deskriptif dari ketiga fraksi dapat dilihat pada Lampiran 7. 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 n-heksan.

Selanjutnya untuk melihat signifikansi diantara hasil ketiga fraksi tersebut dilakukan dengan uji parametrik *one way* ANOVA. Sebelum dilakukan uji *one way* ANOVA dilakukan pengujian normalitas data dan varians sebagai syarat pengujian. Dari hasil uji diketahui bahwa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdistribusi normal dan memiliki varians yang identik sehingga memenuhi persyaratan uji *one way* ANOVA. Hasil analisa uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa rata-rata DZI dari ketiga fraksi tersebut memang berbeda. Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan pada ketiga fraksi tersebut maka dilakukan uji lanjutan melalui *multiple comparison* dengan uji Tukey. Hasil *multiple comparison* dengan uji Tukey dapat dilihat pada Lampiran 7.

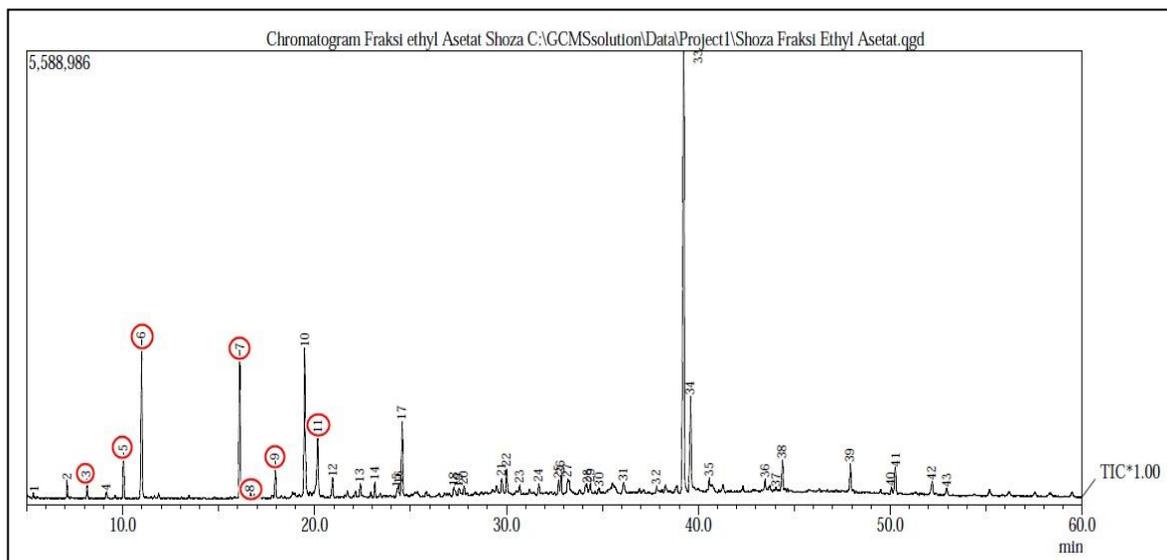
Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa fraksi n-heksan dan fraksi etilasetat lebih signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* daripada fraksi metanol. Namun dari hasil pengujian ini juga

diketahui bahwa fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan memiliki perbedaan yang kecil.

Dari hasil pengujian dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksan dan fraksi etilasetat memiliki kemampuan yang hampir sama dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* dan lebih signifikan daripada fraksi metanol, namun penghambatan terbesar dimiliki oleh fraksi n-heksan.

## **5. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS**

Analisis kandungan kimia metode GC-MS dilakukan untuk identifikasi senyawa organosulfur yang terdapat pada fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan karena terbukti signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Fase diam yang digunakan adalah AGILENTJ%W DB-1 dengan panjang kolom 30 meter dan diameter internal 0,25 mm. Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah gas Helium dengan kecepatan alir 0,54 ml/menit. Dalam instrumen MS digunakan metode pengion *electron impact* dengan energi 70 eV. Kondisi instrumen GC-MS yang lebih lengkap dapat dilihat pada Lampiran 8. Hasil pengujian GC-MS fraksi etilasetat dinyatakan dalam kromatogram Gambar 9 dan kandungan senyawa dapat dilihat pada Tabel 4 atau Lampiran 11. Sedangkan hasil pengujian GC-MS fraksi n-heksan dinyatakan dalam kromatogram Gambar 10 dan kandungan senyawa dapat dilihat pada Tabel 5 atau Lampiran 12.

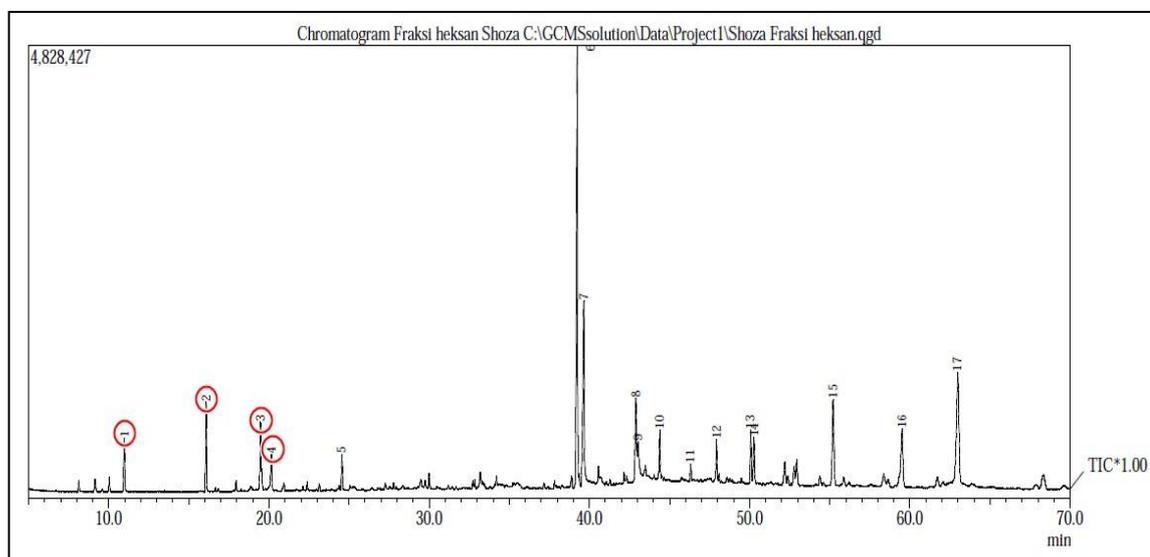


**Gambar 9.** Kromatogram fraksi etilasetat

**Tabel 4.** Senyawa organosulfur fraksi etilasetat

| No. Peak | Rt (menit) | BM  | Nama Senyawa         | Struktur Kimia |
|----------|------------|-----|----------------------|----------------|
| 3        | 8,133      | 114 | Dialil monosulfida   |                |
| 5        | 10,033     | 120 | Metil alil disulfida |                |
| 6        | 10,992     | 164 | Dietil mercaptole    |                |
|          |            | 103 | Dimetilthioasetamida |                |
| 7        | 16,100     | 146 | Dialil disulfida     |                |

|    |        |     |  |                           |
|----|--------|-----|--|---------------------------|
|    |        | 178 | Dialil trisulfida                      | <chem>C=CCSSSC=C</chem>   |
| 8  | 16,658 | 210 | Dialil tetrasulfida                    | <chem>C=CCSSS=C</chem>    |
| 9  | 17,958 | 88  | (E)-(CAS) Trans-metil propenil sulfida | <chem>C=CC=S</chem>       |
| 11 | 20,158 | 144 | 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin               | <chem>C=CC1SCSC1</chem>   |
|    |        | 162 | Allicin                                | <chem>C=CC(=O)SS=C</chem> |



**Gambar 10.** Kromatogram fraksi n-heksan

**Tabel 5.** Senyawa organosulfur fraksi n-heksan

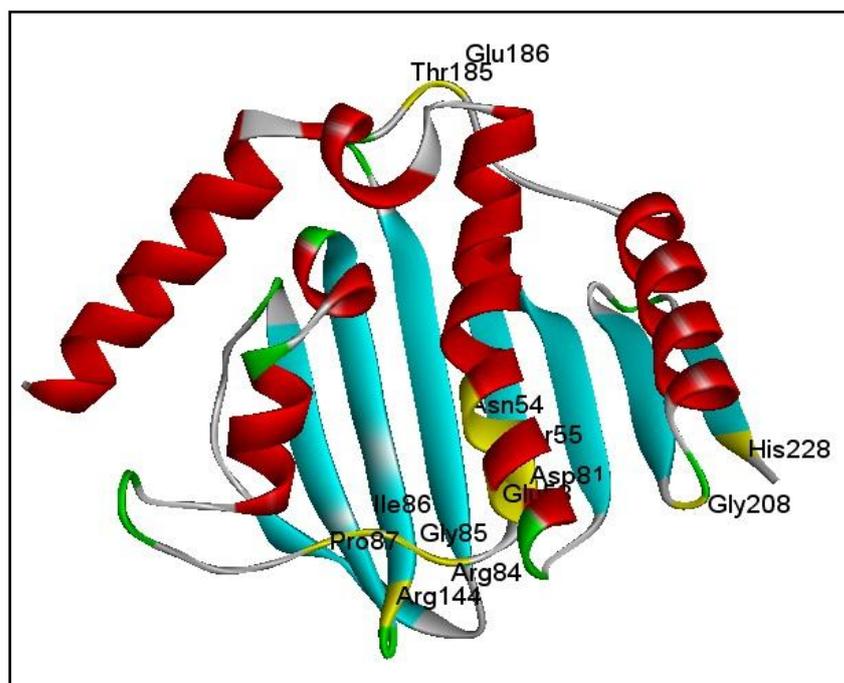
| No. Peak | Rt (menit) | BM  | Nama Senyawa             | Struktur Kimia |
|----------|------------|-----|--------------------------|----------------|
| 1        | 10,975     | 164 | Dietil mercaptole        |                |
|          |            | 103 | Dimetilthioasetamida     |                |
| 2        | 16,083     | 146 | Dialil disulfida         |                |
|          |            | 178 | Dialil trisulfida        |                |
|          |            | 210 | Dialil tetrasulfida      |                |
| 3        | 19,467     | 144 | 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin |                |
|          |            | 162 | Allicin                  |                |
| 4        | 20,150     | 144 | 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin |                |
|          |            | 162 | Allicin                  |                |

Berdasarkan hasil analisis GC-MS diketahui bahwa fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan mengandung senyawa-senyawa organosulfur. Senyawa-senyawa organosulfur ini merupakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap efek antibakteri dari bawang putih (Mikaili *et al*, 2013). Sedangkan senyawa 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin merupakan senyawa yang memiliki efek dalam menghambat agregasi trombosit, siklooksigenase, dan 5-lipoksigenase sehingga berperan dalam regulasi tekanan darah (Nikolic, 2003).

## 6. Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools

### a) Visualisasi Sisi Aktif DNA gyrase subunit B

Untuk mengetahui sisi aktif dari protein DNA gyrase subunit B, maka dilakukan visualisasi protein target secara tiga dimensi melalui aplikasi *Discovery Studio Visualizer*. Hasil visualisasi ditunjukkan dalam Gambar 11.



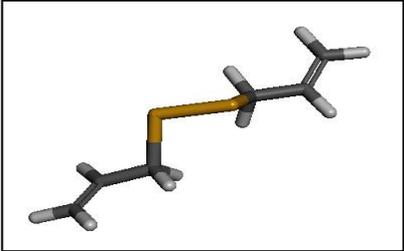
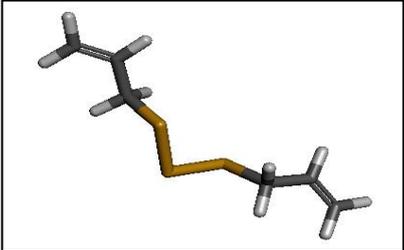
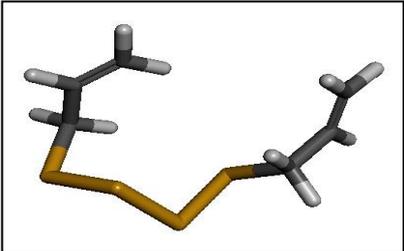
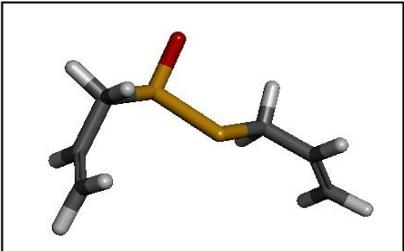
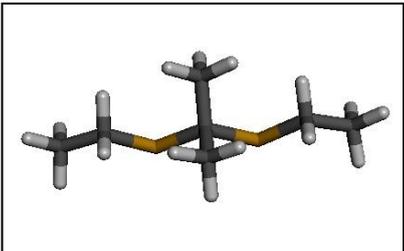
**Gambar 11.** Visualisasi sisi aktif protein DNA gyrase subunit B (3TTZ)

Area berwarna kuning dalam Gambar 11 menunjukkan sisi aktif dari protein target tersebut. Dari hasil tersebut diketahui bahwa sisi aktif dari protein target tersebut terletak pada asam amino asam glutamat 186 (Glu186), threonin 185 (Thr185), prolin 87 (Pro87), isoleusin 86 (Ile86), glisin 85 (Gly85), arginin 84 (Arg84), arginin 144 (Arg144), asparagin 54 (Asn54), serin 55 (Ser55), asam aspartat 81 (Asp81), asam glutamat 58 (Glu58), histidin 228 (His228), dan glisin 208 (Gly208).

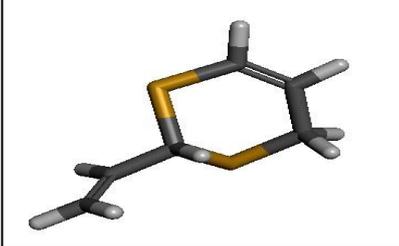
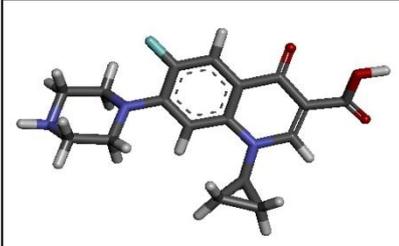
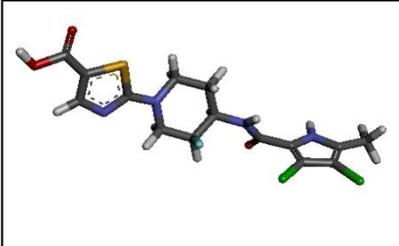
#### **b) Visualisasi Ligan**

Ligan yang digunakan untuk sampel uji *molecular docking* adalah senyawa-senyawa organosulfur yang terdeteksi pada fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri diketahui bahwa aktivitas antibakteri yang signifikan diketahui pada fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan. Sedangkan pada analisis GC-MS diketahui bahwa fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan memiliki kandungan senyawa organosulfur seperti dialil disulfida, dialil trisulfida, dialil tetrasulfida, allicin, 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin, dan dietil mercaptole. Dalam uji ini sebagai pembanding digunakan siprofloksasin dan 2-[(3S,4R)-4-[[3,4-dichloro-5-methyl-1H-pyrrol-2-yl]carbonyl]amino]-3-fluoropiperidin-1-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylic acid (*ref ligand/* ligan referensi). Visualisasi masing-masing ligan ditunjukkan dalam Tabel 6.

**Tabel 6.** Visualisasi Ligan

| No. | Ligan               | Struktur 3 Dimensi   |
|-----|---------------------|--|
| 1.  | Dialil disulfida    |    |
| 2.  | Dialil trisulfida   |   |
| 3.  | Dialil tetrasulfida |  |
| 4.  | Allicin             |  |
| 5.  | Diethyl mercaptole  |  |

---

|    |                          |   |
|----|--------------------------|---|
| 6. | 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin |   |
| 7. | Siprofloksasin           |   |
| 8. | Ligan referensi          |  |

---

### c) Interaksi Ligan terhadap Protein Target

Hasil *docking* antara ligan dan protein target akan menghasilkan 10 konformasi yang berisi informasi energi dari masing-masing konformasi. Hal yang perlu diperhatikan dalam analisis hasil *docking* adalah melalui energi ikatan (*binding energy*) dan konstanta inhibisi (*inhibitory constant*). Konformasi terbaik dapat dilihat melalui fungsi *scoring* yang ditunjukkan dengan energi ikatan atau *binding energy* ( $\Delta G$ ) yang memiliki satuan dalam kkal/mol. Nilai energi ikatan menggambarkan kekuatan ikatan yang terjadi antara ligan dengan protein target.

Energi ikatan memiliki hubungan dengan konstanta inhibisi. Semakin kecil nilai konstanta inhibisi maka akan semakin kecil pula energi ikatan. Dari hal ini diketahui bahwa semakin kecil energi ikatan dan konstanta inhibisi, maka interaksi antara ligan dan enzim akan semakin disukai (Prasetia, 2011). Hasil skor setiap konformasi antara seluruh ligan terhadap protein target dapat dilihat pada Lampiran 13. Sedangkan nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi terbaik serta interaksi antara masing-masing ligan dengan protein target dapat dilihat pada Tabel 7.

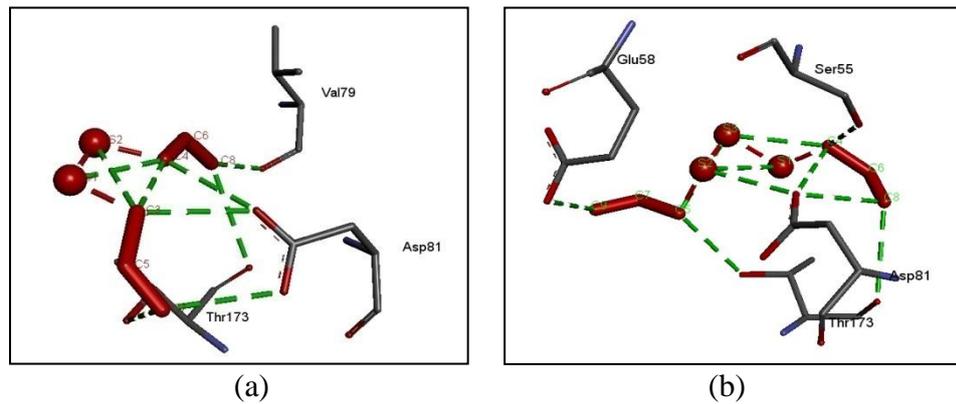
**Tabel 7.** Interaksi Ligan dengan Protein Target

| <b>Ligan</b>             | <b>Energi Ikatan<br/>(kkal/mol)</b> | <b>Konstanta<br/>Inhibisi</b> | <b>Interaksi</b>   |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| 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                           |
| Allicin                  | -4,0                                | 1,17 mM                       | Asp81 dan Ser55  |
| Dietil mercaptole        | -3,74                               | 1,83 mM                       | Gly85, Asp81, Asn54, dan Thr173                          |
| 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin | -4,07                               | 1,04 mM                       | Asp81, Ser55, Thr173, dan Val79                          |
| Siprofloksasin           | -5,79                               | 56,73 $\mu$ M                 | Arg84, Asp81, Glu58, Gly85 Ile86, Ile102, dan Ser129     |
| Ligan referensi          | -8,15                               | 1,06 $\mu$ M                  | Arg144, Arg84, Asn54, Asp81, Glu58, Ile86, Ser55, Thr173 |

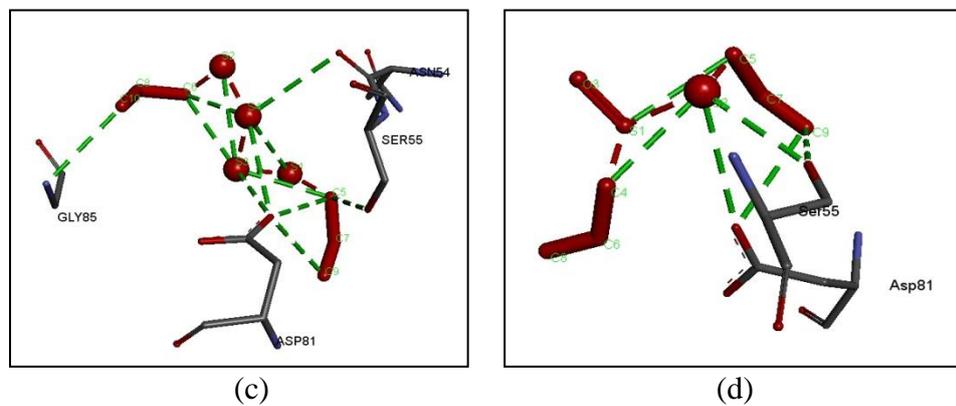
Berdasarkan Tabel 7 tersebut menunjukkan bahwa seluruh senyawa organosulfur yang dipilih menjadi sampel uji mampu berikatan dengan protein target. Dari hasil ini diketahui bahwa *ref ligand/* ligan referensi dan siprofloksasin memiliki energi ikatan lebih kecil daripada seluruh senyawa organosulfur. Namun perbedaan energi ikatan antara seluruh senyawa organosulfur dibandingkan dengan siprofloksasin tidak berbeda jauh. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa organosulfur ini memiliki afinitas yang relatif sama apabila dibandingkan dengan antibiotik siprofloksasin dalam menghambat protein target. Selain itu dapat diketahui juga bahwa senyawa-senyawa organosulfur ini memiliki mekanisme antibakteri yang identik dengan antibiotik siprofloksasin, yaitu dengan menghambat aktivitas dari enzim DNA gyrase subunit B bakteri.

#### **d) Visualisasi Hasil *Docking***

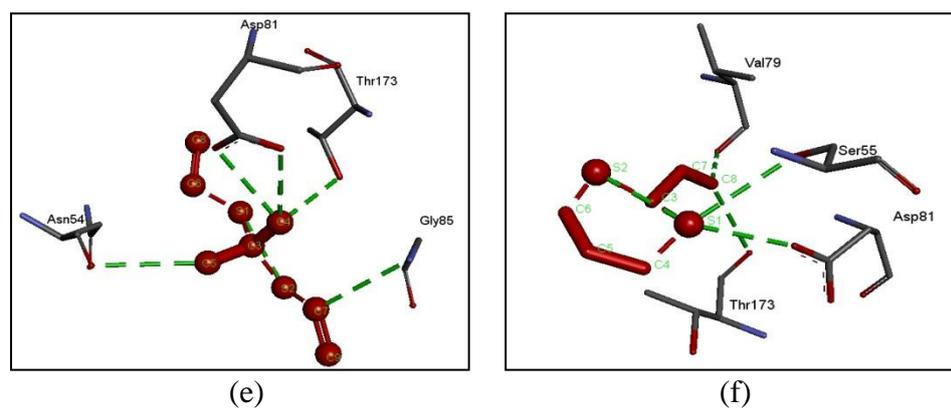
Hasil *docking* antara ligan dan protein target disimpan dalam format \*.dlg dan berisi informasi mengenai energi setiap konformasi yang terbentuk. Namun *file* ini tidak dapat menampilkan secara visual bentuk interaksi kompleks antara ligan dan protein. Dalam hal ini untuk keperluan visualisasi, maka *file* dengan format \*.dlg tersebut perlu dirubah menjadi format \*.pdb dengan bantuan *script* pada Cygwin Terminal. *File* dengan format \*.pdb yang terbentuk kemudian dapat divisualisasikan dengan aplikasi visualisasi seperti *Discovery Studio Visualizer*. Hasil visualisasi interaksi antara masing-masing ligan dengan protein target disajikan dalam Gambar 12, 13, 14, dan 15.



**Gambar 12.** Interaksi 3D antara (a) Diallyl disulfida (b) Diallyl trisulfida dengan DNA gyrase subunit B



**Gambar 13.** Interaksi 3D antara (c) Diallyl tetrasulfida (d) Allicin dengan DNA gyrase subunit B



**Gambar 14.** Interaksi 3D antara (e) Dietil mercaptole (f) 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin dengan DNA gyrase subunit B



pelarut penyari karena merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga mampu melarutkan senyawa yang memiliki kepolaran relatif rendah hingga relatif tinggi (Wulandari, 2011). Proses ekstraksi dilakukan terhadap 10 kg serbuk simplisia dengan 50 liter etanol 70% (1 : 5 b/v). Selama periode ekstraksi ini dilakukan pengadukan secara periodik yang dimaksudkan untuk memberikan kemudahan pelarut untuk melarutkan senyawa yang terdapat dalam sel tanaman. Ekstrak kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga hasil proses ekstraksi ini diperoleh ekstrak kental etanolik.

Ekstrak kental etanolik yang diperoleh pada proses sebelumnya selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan pelarut metanol, etilasetat, dan n-heksan berdasarkan metode ekstraksi cair-cair (*liquid extraction*). Pelarut metanol, etilasetat, dan n-heksan digunakan untuk mendapatkan fraksi ekstrak berdasarkan tingkat kepolaran senyawa yaitu sebagai fraksi polar, semi-polar, dan non-polar.

Ekstrak kental etanolik mula-mula diencerkan dengan aquadest hangat untuk melarutkan ekstrak yang cenderung kental. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan masing-masing pelarut (metanol/etilasetat/n-heksan) dan dihomogenkan. Hasil proses ini akan terbentuk dua lapisan cairan yang terpisah yang disebabkan karena perbedaan massa jenis dari kedua cairan. Proses ini juga menyebabkan ekstrak etanolik yang masih mengandung berbagai konstituen akan terpisah berdasarkan polaritas senyawa terhadap pelarut sehingga untuk pelarut metanol, etilasetat, dan n-

heksan secara berturut-turut akan mendapatkan senyawa yang bersifat polar, semi-polar, dan non-polar. Proses ekstraksi cair-cair ini dilakukan replikasi 2 kali untuk menghindari kejenuhan ekstraksi. Hasil yang didapatkan dari proses ini untuk fraksi ekstrak metanol, etilasetat, dan n-heksan secara berturut-turut sebanyak 219,17 g, 2,47 g, dan 2,33 g.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan fraksi metanol, etilasetat, dan n-heksan dengan konsentrasi 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, dan 75%. Dalam pembuatan larutan sampel dengan variasi konsentrasi tersebut digunakan aquadest sebagai pelarut pengencer. Khusus untuk fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan diperlukan penambahan span 80 sebagai emulgator karena kedua fraksi ekstrak ini cenderung tidak larut dalam aquadest. Tujuan dibuat variasi konsentrasi ini adalah untuk mengetahui nilai KHM dan untuk mengetahui perbedaan nilai DZI antar perlakuan. Metode yang digunakan dalam pengujian ini adalah *Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test*.

Metode Kirby-Bauer digunakan untuk menentukan sensitifitas bakteri patogen baik yang bersifat aerob maupun anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa anti mikroba (Hudzicki, 2013). Dalam penelitian ini metode tersebut dilakukan sedikit modifikasi karena media dan nutrisi yang digunakan dalam metode ini seharusnya Mueller-Hinton agar dan nutrisi McFarland standard, namun dalam penelitian ini digunakan media MacConkey dan menggunakan BHI (*brain heart infusion*) sebagai nutrisi. Penggunaan MacConkey sebagai media dipilih karena media ini spesifik

terhadap bakteri gram negatif sehingga selain bakteri gram negatif tidak dapat berkembang (Hale *and* Keusch, 1996).

Dalam metode ini digunakan *paper disc/* cakram kertas untuk mengaplikasikan agen antibakteri. Cakram kertas yang telah diaplikasikan dengan masing-masing sampel selanjutnya akan mengabsorpsi air dari media agar dan agen antibakteri akan berdifusi ke dalam agar. Kecepatan difusi senyawa antibakteri dari sampel dalam agar tidak secepat keluarnya senyawa antibakteri dari cakram kertas karena tingkat difusi antibakteri dalam agar tergantung pada sifat difusi dan kelarutan senyawa antibakteri dalam media (Bauer *et al*, 1966), berat molekul senyawa antibakteri, dan tebal media (Hudzicki, 2013). Ketika suspensi bakteri diinokulasi ke dalam media dan dalam waktu yang bersamaan dilakukan aplikasi cakram kertas yang mengandung sampel ke dalam media, maka secara simultan pertumbuhan bakteri dan difusi senyawa antibakteri terjadi. Pertumbuhan akan terus terjadi hingga mencapai titik kritis yang ditunjukkan oleh adanya zona hambatan secara radial disekitar cakram kertas. Konsentrasi senyawa antibakteri dalam rentang ini disebut dengan konsentrasi kritis (Hudzicki, 2013).

Pengujian aktivitas antibakteri dari ketiga fraksi pelarut dibuat variasi konsentrasi bertujuan untuk mengetahui perbedaan nilai DZI antar perlakuan. 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 *Shigella flexneri*. Berdasarkan tabel pada Lampiran 4, 5, dan 6 dapat diketahui bahwa

nilai KHM fraksi metanol, fraksi etilasetat, dan fraksi n-heksan berturut-turut berada pada konsentrasi 75%, 5%, dan 1%. Dari hasil tersebut fraksi n-heksan diketahui lebih poten dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Hasil penelitian Rainy *et al* (2014) membuktikan bahwa ekstrak bawang putih dalam pelarut n-heksan terbukti mengandung senyawa-senyawa hasil degradasi allicin seperti senyawa disulfida dan trisulfida dimana senyawa-senyawa ini yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri.

Penelitian aktivitas antibakteri ini digunakan kontrol positif dan kontrol negatif sebagai pembanding. Kontrol positif berfungsi sebagai pembanding apakah setiap perlakuan memiliki efek yang sama terhadap antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif. Sedangkan kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah pelarut pengencer sampel yang digunakan memiliki efek antibakteri. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah siprofloksasin 5 µg. Penggunaan siprofloksasin sebagai kontrol positif karena memiliki mekanisme antibakteri yang diduga identik dengan aktivitas antibakteri bawang putih yaitu dengan menghambat enzim DNA gyrase dan mengganggu aktivitas lain yang terkait dengan DNA (Prescott *et al*, 2005). Sedangkan kontrol negatif digunakan aquades dan campuran antara aquades dan span 80.

Hasil penelitian membuktikan bahwa masing-masing fraksi memiliki efek yang sama seperti antibiotik siprofloksasin sebagai antibakteri, sedangkan kedua kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat.

Berdasarkan Tabel 3, pengujian aktivitas antibakteri siprofloksasin pada ketiga replikasi diketahui memiliki DZI rata-rata 29,667 mm. Menurut standar yang dimuat di *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* menunjukkan bahwa antibiotik siprofloksasin dikatakan sensitif terhadap bakteri keluarga *Enterobacteriaceae* apabila memiliki DZI lebih dari atau sama dengan 21 mm. Berdasarkan data penelitian tersebut diketahui bahwa antibiotik siprofloksasin yang digunakan masih sensitif terhadap bakteri keluarga *Enterobacteriaceae*.

Nilai DZI masing-masing fraksi apabila dibandingkan dengan siprofloksasin dengan menggunakan standar dari CLSI tersebut, maka dapat diketahui bahwa dari ketiga fraksi termasuk kategori resisten karena memiliki DZI kurang dari 15 mm. Namun hal ini tentunya tidak dapat diinterpretasikan sebagai resisten yang sesungguhnya karena interpretasi ini mengacu pada standar antibiotik siprofloksasin dan untuk masing-masing zat antibakteri memiliki standar interpretasi yang berbeda. Selain itu standar interpretasi uji sensitifitas zat antibakteri untuk bahan herbal juga belum tersedia. Berdasarkan hal tersebut diketahui bahwa kekuatan penghambatan masing-masing fraksi diketahui lebih rendah dibandingkan dengan antibiotik siprofloksasin sebagai kontrol positif. Hal tersebut disebabkan karena siprofloksasin merupakan senyawa murni, sedangkan ekstrak merupakan campuran senyawa meskipun telah dilakukan metode fraksinasi.

Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui fraksi yang terbukti signifikan dalam menghambat

pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penghambatan terkecil hingga terbesar secara berturut-turut dimiliki oleh fraksi metanol, fraksi etilasetat, dan fraksi n-heksan. Hasil penelitian ini juga diketahui bahwa fraksi n-heksan dan fraksi etilasetat memiliki penghambatan yang hampir sama dan lebih signifikan apabila dibandingkan dengan fraksi metanol. Hal tersebut diduga karena senyawa-senyawa organosulfur lebih banyak tersari oleh pelarut semi polar dan non polar. Menurut penelitian dari Bakht *et al* (2011) membuktikan bahwa ekstrak metanol tidak menunjukkan zona hambat terhadap berbagai bakteri patogen dibandingkan dengan ekstrak etilasetat.

Uji identifikasi senyawa organosulfur dilakukan secara GC-MS terhadap fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan karena kedua fraksi ini menunjukkan signifikansi pada uji aktivitas antibakteri dibandingkan dengan fraksi metanol. Analisis GC digunakan kolom AGILENT% B DB-1 dan gas helium sebagai fase gerak. Kolom AGILENT% B DB-1 merupakan kolom yang mengandung fase diam berupa 100% *dimethylpolysiloxane* sehingga bersifat non-polar (Agilent Technologies, 2012). Fase diam non-polar digunakan karena jenis sampel yang digunakan berasal dari ekstraksi menggunakan etilasetat dan n-heksan yang bersifat relatif non-polar sehingga diharapkan fase diam ini mampu memisahkan komponen-komponen dalam sampel. Sedangkan penggunaan gas helium sebagai fase gerak karena gas ini memberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik (Gandjar dan Abdul Rohman, 2007).

Berdasarkan hasil identifikasi melalui instrumen GC-MS membuktikan bahwa dalam fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan mengandung senyawa-senyawa organosulfur hasil degradasi allicin seperti dialil monosulfida, dialil disulfida, dialil trisulfida, dialil tetrasulfida, 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin, dan allicin. Allicin akan terbentuk ketika bawang putih dipecah sehingga enzim alliinase akan merubah alliin menjadi allicin. Allicin merupakan senyawa yang sangat tidak stabil dalam temperatur kamar sehingga akan berubah menjadi senyawa derivat sulfur yang lain berdasarkan kondisi lingkungannya [Ilic *et al* (2011) dan Rainy *et al* (2014)]. Dalam analisis GC-MS ini terdeteksi beberapa senyawa hasil degradasi allicin seperti dialil monosulfida, dialil disulfida, dialil trisulfida, dialil tetrasulfida, dan 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin. Senyawa-senyawa tersebut selain 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin telah diketahui memiliki efek sebagai antibakteri (Mikaili *et al*, 2013). Sedangkan menurut penelitian Nikolic pada tahun 2003, senyawa 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin diketahui 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 n-heksan memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Untuk meningkatkan aktivitas antibakteri maka

perlu dilakukan percobaan dengan kondisi yang ketat sehingga meminimalkan degradasi allicin (Rainy *et al*, 2014).

Mekanisme molekuler senyawa-senyawa organosulfur dapat diteliti melalui pengujian secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Aplikasi yang digunakan untuk pengujian secara *in silico* adalah AutoDockTools. Protein yang digunakan sebagai target dalam penelitian ini adalah enzim DNA gyrase subunit B. Protein ini digunakan sebagai target karena terkait dengan penelitian dari Prescott *et al* (2005) yang menduga bahwa senyawa-senyawa organosulfur yang terkandung dalam bawang putih berperan sebagai antibakteri dengan menghambat enzim DNA gyrase dan mengganggu aktivitas lain yang terkait dengan DNA.

Protein ini diketahui dapat dihambat oleh senyawa *pyrrolamide* untuk menghasilkan efek antibakteri (Nickelsen *et al*, 2013). *Pyrrolamide* merupakan kelas baru dari agen antibakteri yang memiliki target pada enzim DNA gyrase sehingga menghasilkan hambatan pada sintesis DNA dan kematian sel bakteri (Nickelsen *et al*, 2013). Senyawa ini memiliki aktivitas antibakteri yang poten terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif.

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah siprofloksasin dan 2-*[(3S,4R)-4-{{[3,4-dichloro-5-methyl-1H-pyrrol-2-yl]carbonyl}amino}-3-fluoropiperidin-1-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylic acid* (ref ligan) sebagai kontrol, serta senyawa-senyawa organosulfur yang muncul pada analisis secara GC-MS dari fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan.

Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua senyawa yang diuji memiliki afinitas dalam mengikat protein target. Ligan referensi dan siprofloksasin sebagai kontrol menghasilkan hasil yang terbaik karena memiliki energi ikatan paling rendah, yaitu masing-masing sebesar -8,15 dan -5,79 kkal/mol. Hasil *docking* terhadap ligan referensi memberikan hasil yang terbaik karena senyawa ini merupakan senyawa *pyrrolamide* yang merupakan ligan asli dari protein ini. Sedangkan senyawa-senyawa organosulfur menghasilkan energi ikatan yang bervariasi namun memiliki selisih yang minimal. Hasil terbaik dari senyawa organosulfur yang diuji adalah 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin dengan energi ikatan sebesar -4,07 kkal/mol.

Hasil tersebut membuktikan bahwa senyawa-senyawa organosulfur dalam fraksi etilasetat dan fraksi n-heksan dari ekstrak etanolik bawang putih memiliki mekanisme yang identik dengan antibiotik siprofloksasin, yaitu dengan menghambat aktivitas enzim DNA gyrase subunit B. Selain itu berdasarkan energi ikatannya, diketahui bahwa senyawa-senyawa organosulfur tersebut memiliki afinitas yang relatif sama dengan antibiotik siprofloksasin.