

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETANOL-AIR DARI
EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.)
TERHADAP BAKTERI *Streptococcus mutans* DAN *Pseudomonas
aeruginosa* SERTA BIOAUTOGRAFI**

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:

**DWI KARTIKA SANTI
K 100 090 163**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2013**

PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETANOL-AIR DARI EKSTRAK
ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TERHADAP BAKTERI
Streptococcus mutans DAN *Pseudomonas aeruginosa*
SERTA BIOAUTOGRAFI**

Oleh :

DWI KARTIKA SANTI

K 100 090 163

Telah disetujui dan disahkan pada :


Hari :

Tanggal :


Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Dekan,


Dr. Muhammad Da'i, M.Si., Apt.

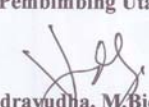
Penguji I


Dr. Muhtadi, M.Si

Penguji II


Dr. Haryoto, M.Sc

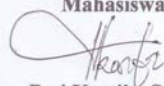
Pembimbing Utama


Peni Indrayudha, M.Biotech., Apt

Pembimbing Pendamping


Rima Munawaroh, M.Sc., Apt

Mahasiswa


Dwi Kartika Santi

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETANOL-AIR DARI EKSTRAK ETANOL
BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TERHADAP BAKTERI *Streptococcus mutans*
DAN *Pseudomonas aeruginosa* SERTA BIOAUTOGRAFI**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ETHANOL-WATER FRACTION FROM
ETHANOL EXTRACT OF GARLIC ON BACTERIA *Streptococcus mutans* AND
Pseudomonas aeruginosa AND BIOAUTOGRAFI**

**Dwi Kartika Santi, Peni Indrayudha, dan Rima Munawaroh
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. A Yani Tromol Pos I, Pabelan Kartasura Surakarta
57102**

ABSTRAK

Bawang putih merupakan salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai antibakteri. Senyawa dalam bawang putih yang berperan sebagai antibakteri adalah *allicin*. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ekstrak etanol bawang putih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Perlunya dilakukan pengujian fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih untuk mengetahui nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Bawang putih diekstraksi menggunakan penyari etanol 96% dengan metode maserasi kemudian dilakukan fraksinasi partisi dengan pelarut bertingkat n-heksan dan etil asetat. Pengujian diawali dengan menggunakan metode difusi sumuran yang bertujuan untuk melihat ada tidaknya aktivitas antibakteri. Pengujian dilusi cair bertujuan untuk menentukan nilai KHM yang ditandai dengan kejernihan larutan uji yaitu konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada media BHI, sedangkan nilai KBM ditandai dengan konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri pada media Mueller Hinton (MH) untuk bakteri *P.aeruginosa* dan Nutrient Agar (NA) untuk bakteri *S.mutans*. Pendeteksian kandungan senyawa dalam bawang putih menggunakan metode bioautografi. Fase diam yang digunakan *silica* gel dan fase gerak yang digunakan etilasetat:metanol:air (160:108:80) v/v yang dilihat pada UV 254 nm, 366 nm dan reagen semprot vanilin asam glisial.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* dan *P. aeruginosa* dengan nilai rata-rata diameter zona hambat $10,5 \pm 1$ mm dan 10 ± 0 mm. KHM masing-masing 125 mg/mL dan 250 mg/mL, sedangkan nilai KBM dari tidak diperoleh. Hasil bioautografi menunjukkan adanya zona jernih pada Rf 0,56. Kromatogram disemprot dengan vanilin asam glisial menghasilkan bercak berwarna biru keabu-abuan yang menandakan senyawa organosulfur.

Kata kunci : Fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih, KHM, KBM, Bioautografi, *S.mutans*, *P.aeruginosa*.

ABSTRAK

Garlic is one of the plants that have merit to be anti bacteria. The components in garlic that can be anti bacteria is allicin. The previous research have stated that the ethanol extract of garlic have the anti bacteria activity toward *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa*. The Testing of ethanol-water fraction extract is needed to know the MIC and MBC to *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The garlic was extracted using ethanol 96% by maceration method then performed fractionation multilevel partition with n-hexane and ethyl acetate. Testing begins with pitting diffusion method which aims to see whether or not the antibacterial activity. The test aims to determine the liquid dilution MIC values are marked by clarity of test solution is the lowest concentration that can inhibit the growth of bacteria on BHI , while the value of MBC is characterized by the lowest concentration that can kill bacteria on MH for bacteri *P.aeruginosa* and NA for *S.mutans*.. The detection contained compounds in garlic bioautografi method. The stationary phase used silica gel and the mobile phase used ethylacetate: methanol: water (160:108:80)v/v were seen in the UV 254 nm, 366 nm and vanillin acid glacial spray reagent.

The results showed that the ethanol-water fraction of ethanol extract of garlic has antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* with average inhibition zone diameter 10.5 ± 1 mm and 10 ± 0 mm. MIC values respectively 125 mg/mL and 250 mg/mL, while the values of MBC were not obtained. Bioautografi results showed clear zone at Rf 0.56. Chromatograms were sprayed with vanili acid glacial produces patches grayish blue is organosulfur

Keywords: Ethanol-water fraction of ethanol extract of Garlic, MIC, MBC, Bioatuografi, *S.mutans*, *P.aeruginosa*.

PENDAHULUAN

Karies merupakan suatu kerusakan gigi yang dimulai dari permukaan dan berkembang ke arah dalam. Pada karies terjadi pembentukan plak pada permukaan email yang keras dan halus (Jawetz *et al.*, 2005). Berdasarkan laporan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Depkes RI tahun 2001 menyatakan, penyakit tertinggi yang tidak dikeluhkan dan dikeluhkan adalah penyakit gigi dan mulut meliputi 60% penduduk.

Streptococcus mutans adalah bakteri Gram positif yang merupakan bakteri kariogenik penyebab utama karies gigi. Karies gigi dapat terjadi karena *S.mutans* menghasilkan asam laktat yang dapat menyebabkan demineralisasi dari permukaan gigi (Putri *et al.*, 2011). Penderita karies gigi lebih lanjut merupakan faktor risiko tertentu untuk penyebab terjadinya infeksi paru-paru anerobik.

Infeksi paru-paru dapat disebabkan karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa*. *P.aeruginosa* adalah batang Gram negatif, bergerak, aerob, beberapa di antaranya

menghasilkan pigmen yang larut dalam air. *P. aeruginosa* sering kali dihubungkan dengan penyakit yang ditularkan secara nosokomial pada manusia, yaitu infeksi yang didapat di rumah sakit. Bakteri ini sering diisolasi dari penderita luka dan luka bakar yang berat. Selain itu bakteri ini dapat menyebabkan infeksi saluran pernapasan (Radji, 2011).

Aloreiny (2011) menunjukkan bahwa bawang putih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dijelaskan dengan nilai MIC pada konsentrasi 3,12%. Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Daka (2011) menjelaskan bahwa bawang putih yang berkonsentrasi 15% memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Hasil penelitian Abubakar (2009) ekstrak etanol bawang putih memiliki aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ditunjukkan dengan nilai KHM 100 mg/mL dan KBM 150 mg/mL.

Palombo (2011) meneliti ekstrak etanol bawang putih dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif patogen mulut seperti *Streptococcus mutans* dengan MIC sebesar 1,1-17,4 mg/mL. Saravana *et al.* (2010) meneliti senyawa *allicin* dalam bawang putih larut dengan pelarut polar dan dapat menghambat bakteri Gram negatif dan Gram positif. Pelarut yang termasuk polar seperti *aquadest*, metanol dan etanol (Sarker *et al.*, 2006). Hal tersebut mendorong peneliti untuk melakukan fraksinasi dan memilih fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih agar dapat diketahui aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Serta mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih yang berfungsi sebagai antibakteri.

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian : Penelitian eksperimental

B. Bahan dan Alat

1. Bahan-bahan yang digunakan

Fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih, bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Muhamadiyah Surakarta, MH (oxid), NA (oxid), BHI (oxid), standar Mc. Farland III 10⁸ CFU/ml, KIA (merck), LIA (oxid), MIO (merck), Nutrien Agar darah, MSA (oxid), akuades, etanol 96%, DMSO 2%, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D.

2. Alat-alat yang digunakan

Blender, alat maserasi, alat gelas pyrex, corong pisah, rotary evaporator (Heidolph), penagas air, cawan porselen, batang pengaduk, neraca analitik, petri, lampu spiritus, rak tabung, ose steril, mikropipet, autoklaf, inkubator, pipet ukur, *Laminar Air Flow* (LAF), pipet volume, pipet tetes, *yellow tips* dan *blue tips*.

C. Jalannya Penelitian

a. Identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman bawang putih dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Identifikasi dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi daun, batang, dan bunga dari tanaman bawang putih dengan pustaka pustaka *Flora of Java* karangan Backer dan Van den Brink, 1965.

b. Penyiapan bahan

Bawang putih didapatkan dari Kelurahan Kaliuso Kecamatan Tawangmangu.

c. Ekstraksi

Pemilihan larutan penyari dilakukan dengan cara menghitung hasil rendemen dan menguji aktivitas antibakteri dari tiap-taip konsentrasi etanol yang digunakan dengan melihat zona hambat, KHM dan KBM.

Simplisia sebanyak 1000 gram dimaserasi dengan pelarut etanol 70% dan 96% sebanyak 7,5 liter kemudian diaduk beberapa kali untuk mendapatkan konsentrasi yang jenuh. Hasil yang didapat kemudian disaring, sedangkan ampasnya diremaserasi. Maserat yang didapat dievaporasi dengan *rotary evaporator* untuk memaksimalkan ekstrak sampai diperoleh ekstrak kental etanol bawang putih.

d. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan cara melarutkan 5 gram ekstrak etanol bawang putih dalam *aquadest*:etanol (1:4) sebanyak 50 ml. Kemudian dipartisi dengan n-heksan dengan perbandingan 1:1 dalam corong pisah dan digojog sehingga terdapat 2 lapisan yang terpisah berdasarkan tingkat kepolarannya. Lapisan yang bersifar non polar terdapat pada bagian atas ditampung disebut fraski n-heksan. Lapisan residu yaitu berupa ekstrak etanol bawang putih yang tidak tertarik ke dalam n-heksan ditambahkan etil asetat dengan perbandingan yang sama dalam corong pisah, digojog dan didiamkan sebentar sampai terlihat 2 lapisan (fraksi etil asetat dan fraksi tak larut etil asetat). Fraksi tak larut etil asetat disebut dengan fraksi etanol-air. Fraksinasi pada tiap tahapan baik fraksi

dengan n-heksan, etil asetat dan fraksi etanol-air yang terkumpul kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* sampai diperoleh fraksi etanol-air yang kental.

e. Sterilisasi alat dan bahan

Semua peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung reaksi, pipet ukur, cawan petri, batang pengaduk, *beaker glass* dicuci bersih kemudian dikeringkan, lalu disterilkan dengan pemanasan kering berupa udara panas atau oven. Pemanasan dilakukan dengan suhu 160°-180° C selama 2 jam. Media, *aquadest*, *blue tip* dan *yellow tip* disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Ose disterilkan dengan cara dibakar.

f. Pembuatan media

Media (BHI), Mueller Hinton (MH) dan Nutrient Agar (NA) dibuat dengan cara mencampurkan dan melarutkan serbuk dalam *aquadest* sesuai dengan cara kerja yang terdapat pada kemasan pH akhir 7,4 kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

g. Orientasi pembuatan stok ekstrak

Stok dibuat dengan konsentrasi 100%, dengan cara menimbang 3g fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih kemudian dilarutkan dengan DMSO 2% sebanyak 3 ml.

h. Identifikasi bakteri uji

- 1) Pewarnaan bakteri
- 2) Uji Biokimia

i. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri induk yang sudah diperoleh dikultur pada media (BHI) kemudian diinkubasi pada 37°C selama 1-2 jam dalam *shaker* inkubator. Suspensi bakteri yang digunakan untuk pengujian konsentrasinya disamakan standar Mc Farland 10^8 CFU/mL, jika konsentrasi melebihi standar Mc Farland 10^8 CFU/mL lalu ditambahkan NaCl 0,9% sampai sama dengan standar Mc Farland. Lalu diencerkan menjadi 1:100 atau sama dengan 10^6 CFU/mL dibuat dengan cara mengambil 1 ml suspensi yang sudah mempunyai konsentrasi 10^8 CFU/mL kemudian ditambahkan 99 ml NaCl.

j. Uji aktivitas antibakteri fraksi etanol-air

1) Difusi sumuran

Dibuat sumuran atau lubang pada media NA yang sudah dinokulasi bakteri *S.mutans* 10^8 CFU/mL dan media MH yang sudah dinokulasi bakteri *P.aeruginosa* 10^8 CFU/mL. Fraksi etanol-air 100% diteteskan sebanyak 20 μ L pada sumuran yang telah dibuat pada media MH dan NA yang telah berisi suspensi bakteri, dan diinkubasi selama 18-24 jam pada 37°C.

2) Dilusi cair

Disiapkan 11 tabung steril 1 sampai 11. Tabung 2 sampai 11 diisi 0,5 mL BHI. Tabung 1 dan 2 diisi 0,5 mL fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih dengan konsentrasi 100%. Tabung 2 diambil 0,5 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung 3, perlakuan sama sampai dengan tabung 9. Tabung 9 dibuang 0,5 mL lalu tabung 10 tidak diisi fraksi polar ekstrak etanol bawang putih. Tabung 1 sampai 10 diisi 0,5 mL suspensi bakteri. Tabung 11 digunakan sebagai kontrol media. KHM ditandai dengan kejernihan larutan uji yaitu konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada media BHI. Pemeriksaan KBM dilakukan dengan mengambil 50 μ L dari setiap tabung yang jernih lalu digoreskan di media MH untuk bakteri *P.aeruginosa* dan media NA untuk bakteri *S.mutans* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

k. Uji kromatografi lapis tipis

- 1) Persiapan larutan uji KLT : 10 mg fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih dilarutkan dalam 500 μ L etanol.
- 2) KLT *silica gel* GF 254 yang telah diaktifkan dengan cara dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam. Larutan ditotolkan pada fase diam sebanyak 3 kali, kemudian dielusi dengan fase gerak etil asetat:metanol:air (160:108:80) v/v.
- 3) Analisis KLT diamati bercaknya pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Bercak diamati dengan pereaksi semprot vanilin asam glasial.

l. Uji aktivitas antibakteri dengan metode bioautografi

Pendeteksian dilakukan dengan cara meletakkan plat *silica* di atas permukaan media MH yang sudah diinokulasi bakteri *P.aeruginosa* 10^8 CFU/mL sebanyak 100 μ L dan media NA yang sudah diinokulasi bakteri *S.mutans* 10^8 CFU/mL sebanyak 100 μ L

selama 20 menit. Setelah itu plat *silica* diambil kemudian media MH dan NA diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 24°C.

D. Analisis Hasil

KHM ditandai dengan kejernihan larutan uji yaitu konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada media BHI. Sedangkan KBM ditandai dengan konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri pada media Mueller Hinton (MH) untuk bakteri *P.aeruginosa* dan Nutrient Agar (NA) untuk bakteri *S.mutans*. Bioautografi diamati dengan melihat ada tidaknya zona jernih pada bercak-bercak kromatogram yang dapat menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Identifikasi Tanaman

Identifikasi bertujuan untuk menetapkan kebenaran ciri-ciri morfologi secara makroskopis terhadap pustaka *Flora of Java* karangan Backer dan Van den Brink, 1965. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa tanaman yang diidentifikasi adalah (*Allium sativum* L.) bawang putih.

B. Pemilihan Larutan Penyari

Optimasi penyari dilakukan untuk memperoleh konsentrasi etanol sebagai pelarut dalam maserasi. Optimasi ini didasarkan pada hasil rendamen ekstrak dan aktivitas antibakteri. Konsentrasi etanol yang digunakan dalam optimasi penyari yaitu 70% dan 96%. Hasil yang diperoleh hasil rendamen ekstrak dengan pelarut etanol 96% lebih besar dibandingkan dengan etanol 70%. Zona hambat yang dihasilkan dari ekstrak dengan pelarut 96% lebih besar dibandingkan dengan etanol 70%. Nilai KHM yang ditunjukkan ekstrak dengan pelarut etanol 96% lebih kecil dibandingkan dengan etanol 70%. Hasil dari optimasi menjelaskan bahwa ekstraksi dengan etanol 96% digunakan untuk fraksinasi dan menguji aktivitas antibakteri.

Tabel 1. Uji Pendahuluan Ekstrak Etanol bawang putih

Konsentrasi etanol	Hasil rendamen	Kadar/ sumuran	Zona hambat		KHM	
			<i>S.mutans</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.mutans</i>	<i>P.aeruginosa</i>
70%	20,849%	20 mg	-	8 mm	25%	25%
96%	20,982%	20 mg	15 mm	10 mm	6,25%	25%

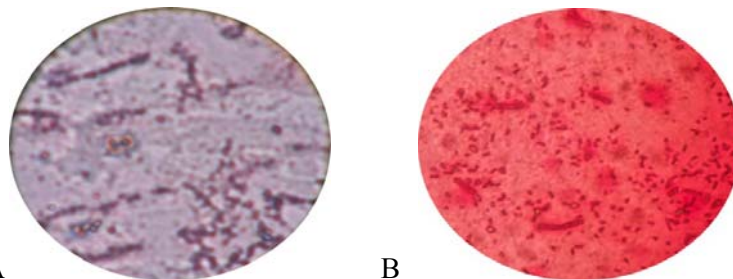
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi adalah metode yang umum digunakan untuk mengekstraksi tanaman dalam jumlah kecil. Metode ini dilakukan dengan cara merendam simpilisa dalam pelarut yang sesuai, kemudian dilakukan pemisahan antara mestrum dan ampas. Maserasi dilakukan 3-4 hari sampai simpilisa yang larut melarut (Sarker *et al.*, 2005). Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah etanol 96% hasil rendamen 20,982%.

C. Fraksinasi

Metode fraksinasi yang digunakan adalah partisi. Teknik pemisahan partisi pelarut melibatkan dua pelarut yang bercampur dalam corong pisah, setelah itu akan memisah sesuai dengan koefisien partisinya. Metode ini relatif mudah untuk dilakukan dan efektif sebagai langkah awal dalam pemisahan senyawa ekstrak mentah (Sarker *et al.*, 2005). Pelarut yang digunakan dibedakan berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dimulai dengan pelarut non polar kemudian semi polar. Hasil fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih diperoleh rendemen 31,25%.

D. Identifikasi Bakteri

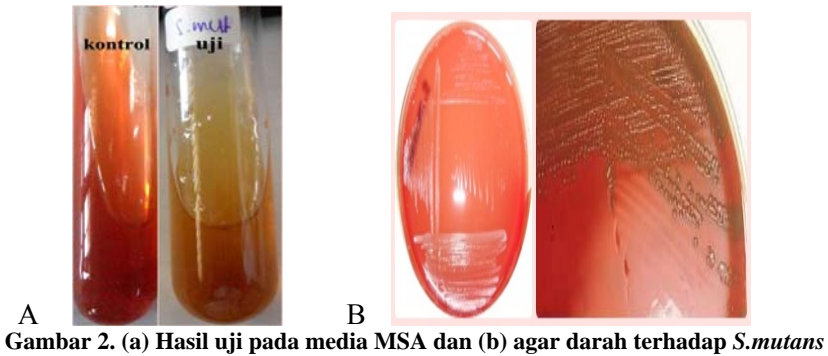
Identifikasi bakteri dilakukan untuk mengetahui golongan bakteri. Identifikasi pertama dilakukan dengan cara pengecatan Gram terhadap bakteri *S.mutans* dan *P.aeruginosa*. Bakteri *S.mutans* merupakan bakteri Gram positif, sedangkan bakteri *P.aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif. Hasil pengecatan Gram setelah diamati di bawah mikroskop menunjukkan bahwa bakteri *S.mutans* yaitu berbentuk bulat, rantai, dan berwarna ungu (Gambar 1.A). Hasil pengecatan bakteri *P.aeruginosa* berbentuk batang, menyebar dan berwarna merah (Gambar 1.B).



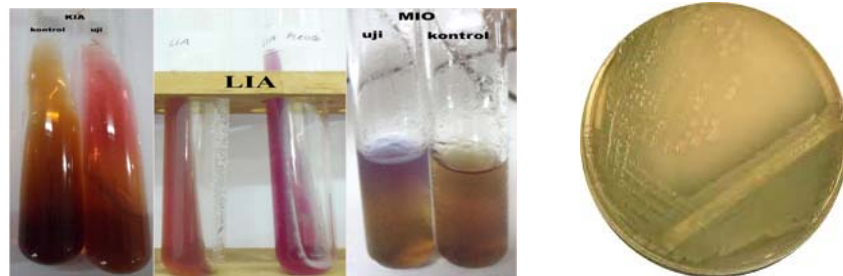
Gambar 1. Hasil pengecatan Gram bakteri (A) *S.mutans* dan (B) *P.aeruginosa*.

Identifikasi bakteri *S.mutans* pada media MSA menunjukkan bahwa terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning, hal ini menunjukkan bahwa bakteri dapat menfermentasi

manitol (Nyoman, 2011). Identifikasi *S.mutans* pada media agar darah membentuk hemolitikus alfa (Spicer, 2000).



Identifikasi berikutnya dilakukan uji biokimia terhadap *P.aeruginosa* dengan media KIA, LIA, dan MIO. Hasil uji identifikasi bakteri *P.aeruginosa* secara biokimiawi, pada media KIA (*Kliger Iron Agar*) bagian tegak berwarna kuning sedangkan bagian miring media warna merah. Hal ini menjelaskan bahwa *P.aeruginosa* tidak dapat memfermentasi glukosa dan membentuk suasana basa, selain itu *P.aeruginosa* tidak memproduksi H₂S hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media KIA. Pada media LIA (*Lysine Iron Agar*) bagian tegak dan miringnya berwarna tetap ungu, hal ini menunjukkan bahwa terbentuknya suasana basa dan tidak mengalami reaksi dekarboksilasi lisin. Pada media MIO (*Motility Indole Ornithine*) tidak terjadi perubahan tetap berwarna ungu dan bakteri bersifat motil. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terjadi reaksi dekarboksilasi ornitin negatif dan bakteri bersifat motil karena terjadi pergerakan (Gambar 3). Identifikasi biokimia *P.aeruginosa* sesuai dengan teori, yaitu bakteri *P.aeruginosa* bersifat motil, tidak memfermentasi glukosa, dan tidak memproduksi H₂S (Brooks *et al.*, 2005). Pertumbuhan *P.aeruginosa* pada media MacConcey berwarna kuning kehijauan, hal ini menjelaskan bahwa *P.aeruginosa* tidak meragi laktosa dan seringkali menghasilkan pigmen piosianin berwarna kehijauan (Spicer, 2000).



Gambar 3. Hasil uji pada media KIA, LIA, MIO dan MacConkey terhadap *P.aeruginosa*.

E. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Difusi sumuran

Penelitian diawali dengan menguji ada tidaknya aktivitas antibakteri fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih dengan menggunakan metode difusi sumuran. Prinsip uji difusi sumuran yaitu dengan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dari DMSO, ekstrak etanol bawang putih dan fraksi etanol-air dari ekstrak bawang putih pengamatan dilakukan setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰ C. Pengujian ini menggunakan DMSO 2% sebagai kontrol negatif. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri dari pelarut.

Hasil yang diperoleh dari pengujian dengan metode difusi sumuran menunjukkan ekstrak etanol bawang putih dan fraksi-fraksinya mempunyai aktivitas antibakteri. Ekstrak etanol bawang putih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S.mutans* dan *P.aeruginosa* dengan masing-masing zona hambatnya 13,5±2,38 mm dan 10±0 mm. Rata-rata diameter zona hambat dari fraksi etanol-air terhadap *S.mutans* 10,5±1 mm. Hasil pengujian fraksi etanol-air terhadap *P.aeruginosa* 10±0 mm. Fraksi semi polar memiliki diameter zona hambat terhadap *S.mutans* 15,63±1,25 mm dan terhadap *P.aeruginosa* 12±0 mm. Fraksi non polar memiliki rata-rata diameter zona hambat terhadap *S.mutans* 13,25±1,25 mm dan terhadap *P.aeruginosa* 10,25±0,57 mm. DMSO 2% tidak menunjukkan aktivitas antibakteri karena DMSO 2% kontrol negatif. Saravana *et al.* (2010) menjelaskan bahwa ekstrak air bawang putih memiliki zona hambat pada bakteri *Streptococcus mutans* sebesar 6 mm, sedangkan ekstrak metanolnya memiliki zona hambat pada bakteri *Streptococcus mutans* sebesar 2 mm. Woods-Panzaru *et al.* (2009) menjelaskan bahwa ekstrak air bawang putih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P.aeruginosa* sebesar 6 mm. Durairaj (2009) menunjukkan bahwa ekstrak etanol bawang putih memiliki zona hambat terhadap *P.aeruginosa* sebesar 10 mm.

2. Dilusi cair

Tahapan uji selanjutnya adalah menguji aktivitas antibakteri fraksi etanol-air dari ekstrak bawang putih terhadap bakteri *S.mutans* dan *P.aeruginosa* dengan menggunakan metode dilusi cair. Prinsip uji dilusi cair adalah adanya pengenceran tiap larutan uji yang ditambahkan dengan suspensi bakteri pengamatan dilakukan setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰ C.

Pada pengujian dengan metode dilusi cair digunakan, 2 kontrol yaitu, kontrol media yang berisi BHI dan kontrol negatif yang berisi suspensi bakteri dengan media BHI. Penggunaan kontrol digunakan untuk membandingkan hasil uji terhadap bahan-bahan yang digunakan menandakan bahan tidak mempengaruhi hasil uji. Kontrol media digunakan untuk menandakan bahwa media yang digunakan dalam penelitian ini terbukti steril tidak terkontaminasi dengan mikroba, sedangkan kontrol suspensi bakteri digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri. Kadar yang digunakan dalam pengujian ini adalah 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 15,6 mg/mL, 7,8 mg/mL, 3,9 mg/mL dan 1,95 mg/mL.

Fraksi etanol-air dari ekstrak bawang putih memiliki nilai KHM terhadap *S.mutans* 125 mg/mL dan terhadap *P.aeruginosa* 250 mg/mL. Ekstrak etanol bawang putih memiliki nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) terhadap *S.mutans* sebesar 31,25 mg/mL dan terhadap *P.aeruginosa* 125 mg/mL. Nilai KHM yang dimiliki oleh fraksi semi polar ekstrak etanol bawang putih terhadap *S.mutans* sebesar 125 mg/mL dan terhadap *P.aeruginosa* 250 mg/mL. Fraksi non polar memiliki nilai KHM terhadap *S.mutans* 125 mg/mL dan *P.aeruginosa* 250 mg/mL. Hasil KBM dari ekstrak etanol bawang putih dan semua fraksinya tidak diperoleh.

Tabel 2. Uji aktivitas antibakteri fraksi etanol-air dilusi terhadap *S.mutans* dan *p.aeruginosa* (n= 4)

No	Kadar Larutan Uji (mg/mL)	Hasil Pengamatan			
		Dilusi cair		Subkultur media padat	
		<i>S.mutans</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.mutans</i>	<i>P.aeruginosa</i>
1	500	--	--	++	++
2	250	--	--	++	++
3	125	--	--	++	++
4	62,5	++	++	X	X
5	31,25	++	++	X	X
6	15,6	++	++	X	X
7	7,8	++	++	X	X
8	3,9	++	++	X	X
9	1,95	++	++	X	X
10	K.suspensi	++	++	++	++
11	K.media	--	--	--	--

Ket (--) : jernih (++) : ada koloni (X) : tidak dilakukan

Bawang putih mengandung *alliin* dan turunan alkilnya (*metil alliin* dan *propyloalliin*) (Kim *et al.*, 2005). Pemeriksaan kandungan senyawa bawang putih yang dilakukan oleh Shobana *et al* (2009) dengan metode HPTLC (*Hing Performance Thin Layer Chromatography*) menunjukkan bahwa bawang putih memiliki senyawa *allicin*. Pemecahan *alliin* dengan bantuan enzim *allinase* pada saat bawang putih diiris-iris atau dihaluskan

menghasilkan *allicin*, asam piruvat dan ion NH_4^+ (Song dan Milner, 2001). *Allicin* bersifat tidak stabil (Amagase *et al.*, 2001), sehingga mudah mengalami reaksi lanjut dan dapat terpecah menjadi *ajoene*, *alixin*, *sulfida diallyl*, *vinylidithiin* (Cutler dan Wilson, 2004) hal ini tergantung dari kondisi pengolahan atau faktor eksternal lain seperti penyimpanan, suhu, dan lain-lain.

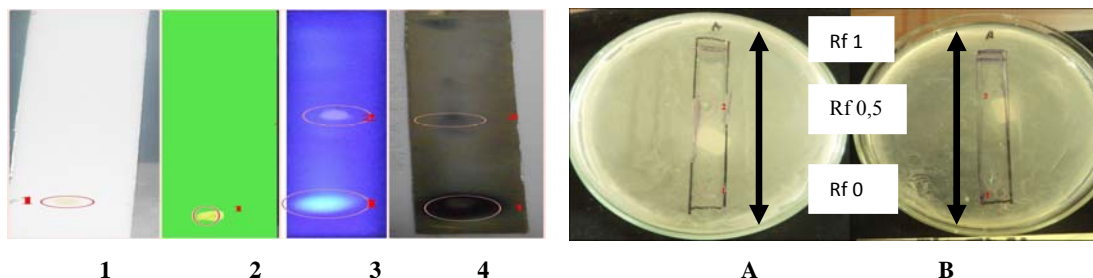
Bakri dan Douglas (2005) menjelaskan bahwa *allicin* yang terdapat dalam ekstrak bawang putih memiliki aktivitas terhadap bakteri Gram-positif termasuk *Streptococcus mutans* dengan KHM 35,7-142,7 mg/mL. Abubakar (2009) ekstrak etanol bawang putih memiliki aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ditunjukkan dengan nilai KHM 100 mg/mL dan KBM 150 mg/mL. Mekanisme antibakteri dari *allicin* adalah dengan cara menghambat sintesis RNA dan merusak dinding sel bakteri (Durairaj, 2010). Penghambatan sintesis RNA dilakukan dengan cara membentuk ikatan yang sangat kuat pada enzim bakteri yaitu *DNA Dependent RNA Polymerase* sehingga dapat menghambat sintesis RNA bakteri (Jawetz *et al.*, 2005). Penghambatan dinding sel dilakukan dengan cara menginhibisi biosintesis dipeptidoglikan yang akan memberikan kekuatan dan rigiditas pada dinding sel (Wilson, 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa KHM *P.aeruginosa* dari lebih besar dibandingkan dengan KHM dari *S.mutans*. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan susunan dinding sel antara kedua bakteri tersebut. Komponen dinding sel dari *P.aeruginosa* lebih kompleks yaitu lapisan yang terdiri dari peptidoglikan dan membran luar yang berfungsi untuk menghalangi proses fagositosis dan masuknya antibakteri (Radji, 2010), sedangkan bakteri *S.mutans* lebih rentan terhadap antibakteri karena memiliki lapisan peptidoglikan pada bagian luar yang permeable (Ravikumar *et al.*, 2011). KHM dari ekstrak etanol bawang putih memiliki aktivitas terbesar dibandingkan dengan fraksi-fraksinya. Hal tersebut dikarenakan ekstrak bawang putih memiliki senyawa yang lebih kompleks dibandingkan dengan fraksi-fraksinya. Hasil penelitian yang diperoleh memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kecil dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, hal ini dimungkinkan karena terjadi perbedaan tempat tumbuh bawang putih atau jenis bawang putih yang digunakan karena akan mempengaruhi kandungan senyawa bawang putih.

F. Bioautografi

KLT yaitu metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa secara fisika-kimia berdasarkan dengan komponen fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah *silica* gel, sedangkan fase geraknya adalah etil asetat:metanol:air (160:108:80) v/v. Hasil KLT fraksi etanol-air dari ekstrak bawang putih yang dielusi dengan fase gerak tersebut kemudian diamati di UV 254 nm terjadi pepadaman dan di UV 366 nm terjadi fluoresensi dengan Rf 0,56.

Senyawa yang tidak dapat tampak secara visual disemprot dengan reagen vanillin asam glasial. Penyemprotan dengan vanillin asam glasial memberikan warna bercak abu-abu kebiruan yang menandakan adanya senyawa organosulfur Rf yang dihasilkan yaitu Rf 0,56. Menurut Waggner (1995) ekstrak bawang putih yang disemprot dengan vanillin asam glasial menunjukkan warna abu-abu, abu-abu keunguan atau coklat dengan kisaran Rf 0,2-0,55. *Allicin* akan ditunjukkan dengan warna abu-abu kecoklatan. Senyawa organosulfur akan menunjukkan warna kuning kecoklatan atau abu-abu kebiruan.



Gambar 4. Plat hasil KLT dan bioautografi fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih
Keterangan :

- 1 : pengamatan plat hasil elusi secara visual 3 : pengamatan plat hasil elusi pada UV 366
2 : pengamatan plat hasil elusi pada UV 254 4 : pereaksi semprot vanillin asam glasial
A : uji bioautografi terhadap *S.mutans* B : uji bioautografi terhadap *P.aeruginosa*

Bioautografi dilakukan untuk mengetahui senyawa dalam fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih yang mempunyai aktivitas antibakteri. Pendeteksian senyawa menggunakan plat KLT yang sebelumnya sudah ditotolkan fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih dan dielusi. Konsentrasi fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih yang digunakan 50% dalam etanol dengan tolotan sebanyak 2 μ L. Kandungan fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih sebesar 0,1 mg.

Hasil uji bioautografi dari fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih pada *S.mutans* dan *P.aeruginosa* terdapat zona jernih pada Rf 0,56. Hasil penelitian ini dapat

diketahui bahwa fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih mempunyai aktivitas antibakteri *S.mutans* dan *P.aeruginosa* karena memiliki senyawa organosulfur.

Bawang putih memiliki dua senyawa organosulfur yaitu asam amino non-volatil γ -glutamil-Salk(en)il-L-sistein dan minyak atsiri S-alk(en)ilsistein sulfoksida atau alliin. γ -glutamil-Salk(en)il-L-sistein akan mengalami reaksi enzimatis yang takan menghasilkan banyak senyawa turunan, melalui dua cabang reaksi, yaitu jalur pembentukan *thiosulfinat* dan *S-allil sisteine* (SAC). Dari jalur pembentukan *thiosulfinat* akan dihasilkan senyawa *allicin*. Selanjutnya dari jalur ini akan dibentuk kelompok *allil sulfida*, *dithiin*, *ajoene*, dan senyawa sulfur lain (Song dan Milner, 2001). Senyawa organosulfur yang larut dalam pelarut polar seperti *S-allil sisteine* (SAC) (Amagase, 2006). Senyawa organosulfur memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kecil dibandingkan dengan senyawa *allicin*. Senyawa organosulfur dengan konsentrasi lebih dari 116 $\mu\text{g/mL}$ dapat membunuh bakteri Gram positif dan Gram negatif, tetapi untuk dapat membunuh bakteri *P.aeruginosa* dibutuhkan konsentrasi lebih dari 500 $\mu\text{g/mL}$ (Naganawa, 2000).

KESIMPULAN

1. Fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Pseudomonas aeruginosa*, dengan Kadar Hambat Minimum (KHM) berturut-turut adalah 125 mg/mL dan 250 mg/mL, sedangkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) tidak diperoleh.
2. Senyawa yang terkandung di dalam fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih adalah organosulfur.

SARAN

1. Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut senyawa-senyawa yang terdapat dalam kandungan masing-masing fraksi bawang putih yang mempunyai aktivitas antibakteri.
2. Perlu dilakukan uji antibakteri terhadap bakteri jenis lain dari senyawa yang terkandung dalam fraksi etanol-air dari ekstrak etanol bawang putih.

DAFTAR ACUAN

- Abubakar, E.M., 2009, Efficacy of Crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (4), 179-185.
- Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. , 2001, Intake of garlic and bioactive components, *Journal of Nutrition*, 131 (3), 955-962.
- Amagase, H., 2006, Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic, *The Journal of Nutrition*, 136 (5), 716-725.
- Alorainy, S.M., 2011, Evaluation of Antimicrobial Activity of Garlic (*Allium sativum*) against *E.coli* O₁₅₇:H₇, *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*, 4 (2), 149-157.
- Daka, D., 2011, Antibacterial Effect of Garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An In Vitro Study, *African Journal of Biotechnology*, 10 (4), 666-669.
- Durairaj, S., Srinivasan, S., Lakshmanaperumalsamy, P., 2010, In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature, *Electronic Journal of Biology*, 6 (4), 92-97.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., & Adelberg, E.A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Maulany, R. F., dan Edinugroho, 371-378, Jakarta, Salemba Madika.
- Kudva, S., Prabhakar, S., Pai, V., & Tegginamani, A., 2012, Effects of Garlic Extract on Salivary pH: A Clinical Study, *Journal of the School of Dental Sciences*, 7 (1), 8-12.
- Naganawa, R., Namiwata, Wa, I.K., Fukuda, H., Fujino, T., & Suzuki, A., 2000, Inhibition of Microbial Growth by Ajoene, a Sulfur-Containing Compound Derived from Garlic, *Journal American Society for Microbiology*, 62 (11), 4238-4242.
- Sarker, D., Satyajit., Latif, Z., & Gray, I.A., 2005, *Natural Products Isolation*, 2nd Ed, 283-285, New Jersey, Humana Press.
- Sarvana, P., Ranya, V., Sridhar, H., Balamurugan, V., & Umantaheswari, S., 2010, Antibacterial Activity of *Allium sativum* L. on Pathogenic Bacterial Strains, *Journal of Global Veterinaria*, 4 (5), 519-522.
- Wagner, H., & Bladt S., 1995, *Plant Drug Analysis*, Second Edition, 293-295, Springer.