

**UJI SINERGITAS ANTIBAKTERI DARI EKSTRAK
BAWANG HITAM (BLACK GARLIC) DENGAN
AMOXICILLIN TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
Pseudomonas sp.**

**ANTIBACTERIAL SYNERGY TEST OF BLACK GARLIC
EXTRACT WITH AMOXICILLIN AGAINST THE
GROWTH OF *Pseudomonas* sp. BACTERIA**

ISRANINGSIH

N111 16 548



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**UJI SINERGITAS ANTIBAKTERI DARI EKSTRAK BAWANG HITAM
(BLACK GARLIC) DENGAN AMOXICILLIN TERHADAP PERTUMBUHAN
BAKTERI *Pseudomonas* sp.**

**ANTIBACTERIAL SYNERGY TEST OF BLACK GARLIC EXTRACT WITH
AMOXICILLIN AGAINST THE GROWTH OF *Pseudomonas* sp.
BACTERIA**

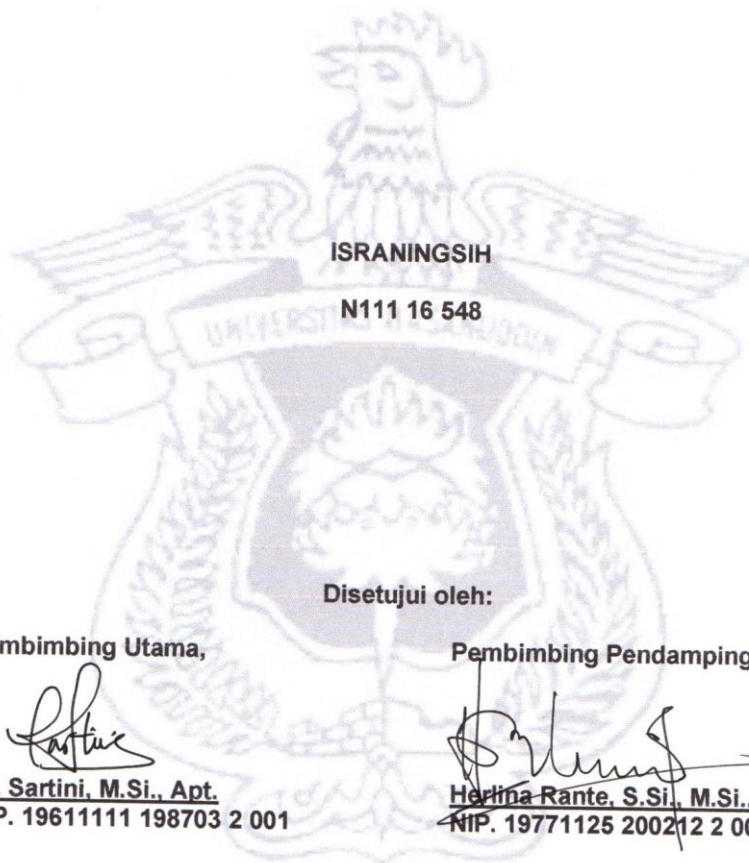
SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**ISRANINGSIH
N111 16 548**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

UJI SINERGITAS ANTIBAKTERI DARI EKSTRAK BAWANG HITAM (BLACK GARLIC) DENGAN AMOXICILLIN TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Pseudomonas* sp.



ISIRANINGSIH

N111 16 548

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Dr. Sartini, M.Si., Apt.
NIP. 19611111 198703 2 001

Pembimbing Pendamping,

Harlina Rante, S.Si., M.Si., Apt
NIP. 19771125 200212 2 003

Pada tanggal 9 Juni 2020

SKRIPSI

UJI SINERGITAS ANTIBAKTERI DARI EKSTRAK BAWANG HITAM (BLACK GARLIC) DENGAN AMOXICILLIN TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Pseudomonas sp.*

ANTIBACTERIAL SYNERGY TEST OF BLACK GARLIC EXTRACT WITH AMOXICILLIN AGAINST THE GROWTH OF *Pseudomonas sp.* BACTERIA

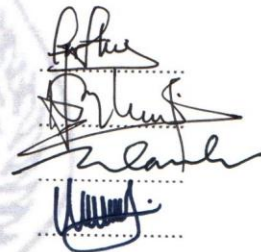
Disusun dan diajukan oleh:

ISRANINGSIH
N111 16 548

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 09 Juni 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat.

Panitia Penguji Skripsi:

1. Ketua : Dr. Sartini, M.Si., Apt.
2. Sekretaris : Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.
3. Anggota : Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
4. Anggota : Nana Juniarti, S.Si., M.Si., Apt.



Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin


Subehan, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19750925 200112 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini merupakan karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan sebelumnya untuk memperoleh gelar sarjana di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh batal demi hukum.

Makassar, 9 Juni 2020

Yang menyatakan,




Istianingsih
N111 16 548

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi berjudul "Uji Sinergitas Antibakteri dari Ekstrak Bawang Hitam (*Black Garlic*) dengan *Amoxicillin* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* sp." yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin ini dapat terselesaikan. Shalawat serta salam tidak lupa selalu tercurahkan kepada Rasulullah Shalallahu Alaihi Wasallam yang telah membawa umat islam ke jalan yang diberkahi Allah Subhanahu Wa Ta'ala.

Perjuangan yang panjang untuk menyelesaikan skripsi ini tidak lepas dari bantuan banyak pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua tercinta, Ayahanda Sudirman dan Ibunda Minasih yang telah memberikan banyak kasih sayang, doa, motivasi, dan dukungannya baik dalam bentuk materi maupun non materi, serta adikku tercinta Mulyanti dan Muhammad Agims yang juga selalu memberikan semangat dan dukungan meskipun berada jauh dari penulis.

Pada kesempatan ini penulis juga ingin mengucapkan terima kasih dengan hormat dan tulus kepada berbagai pihak, terutama kepada:

1. Dekan Fakultas Farmasi, para Wakil Dekan, serta Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, yang telah memberikan ilmu

dan pengalaman yang sangat bermanfaat bagi penulis.

2. Para pembimbing, yaitu Ibu Dr. Sartini, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama sekaligus penasehat akademik penulis yang telah memberikan banyak nasehat selama mengikuti perkuliahan dan telah meluangkan waktu dan tenaga dalam memberikan masukan, bimbingan dan saran dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi serta bantuan bahan-bahan penelitian kepada peneliti. Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt., selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing dan memberikan saran dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Para penguji, yaitu Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. dan Ibu Nana Juniarti, S.Si., M.Si., Apt., yang senantiasa telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan skripsi.
4. Para Laboran di setiap laboratorium, terkhusus kepada ibu Haslia, S.Si., kak Dewi, dan kak Abdi yang senantiasa memberikan arahan, saran dan bimbingan dalam pelaksanaan penelitian, membantu dan menyediakan beberapa keperluan penelitian selama proses pengerjaan penelitian di laboratorium.
5. Para teman peneliti dan teman asisten di Laboratorium Mikrobiologi serta Korps Asisten Fitokimia yang selalu membantu, memberikan doa, dan semangat kepada penulis selama penelitian, serta senantiasa menemani pengerjaan di laboratorium, berbagi keluh kesah penelitian,

dan berbagi alat maupun bahan penelitian.

6. Teman angkatan 2016 yang telah memberi dukungan kepada penulis selama berkuliah di Fakultas Farmasi.
7. Sahabat sekaligus teman seperjuangan selama berkuliah di Farmasi, Dewi, Sri, Laila, dan teman-teman lainnya yang tidak sempat penulis sebutkan satu per satu, yang selalu membantu, berbagi keluh kesah, dan memberikan semangat dalam melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi.
8. Semua pihak yang tidak sempat disebutkan namanya satu per satu atas bantuan dan kerja samanya kepada penulis selama melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi.

Penulis menyadari skripsi ini masih terdapat beberapa kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Maka dari itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik guna menambah wawasan agar pengerjaan penelitian selanjutnya dapat lebih baik. Semoga penelitian dan skripsi ini bermanfaat bagi keilmuan Farmasi dan kepada masyarakat.

Makassar, 9 Juni 2020



Israningsih

ABSTRAK

ISRANINGSIH. *Uji Sinergitas Antibakteri dari Ekstrak Bawang Hitam (Black Garlic) dengan Amoxicillin terhadap Pertumbuhan Bakteri Pseudomonas sp.* (dibimbing oleh Sartini dan Herlina Rante)

Sinergitas antibakteri dari bahan alam dengan antibiotika merupakan pengembangan baru untuk mengatasi resistensi antibiotika terhadap bakteri patogen. Senyawa bahan alam dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas antibakteri dari antibiotika. Salah satu bahan alam yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antibakteri adalah bawang hitam. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek sinergis antibakteri dari kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Uji sinergitas antibakteri dilakukan dengan metode *microdilution checkerboard assay*, menggunakan *microplate 48 wells* dengan menghitung nilai indeks konsentrasi hambat fraksional (FICI). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak bawang hitam 20 mg/mL dan KHM amoksisilin >0,032 mg/mL, sedangkan nilai KHM kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin tetap 20 mg/mL, dan nilai KHM kombinasi amoksisilin dengan ekstrak bawang hitam tetap >0,032 mg/mL. Interaksi dari kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin tidak menyebabkan penurunan ataupun peningkatan aktivitas antibakteri dibandingkan penggunaan secara tunggal, dengan nilai FICI sebesar 2, sehingga dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin tidak terdapat efek sinergis terhadap bakteri *P.aeruginosa* ATCC 27853.

Kata Kunci: sinergitas, bawang hitam, *Allium sativum* L., amoksisilin, FICI, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

ISRANINGSIH. *Antibacterial Synergy Test of Black Garlic Extract with Amoxicillin Against The Growth of Pseudomonas sp.* (supervised by Sartini and Herlina Rante)

Antibacterial synergy from natural ingredients with antibiotics is a new development to overcome antibiotic resistance to pathogenic bacteria. Natural compound can be used to increase the antibacterial activity of antibiotics. One of the natural ingredients that has the potential to be developed as an antibacterial agent is black garlic. The purpose of this study was to determine the synergistic effect of antibacterial from the combination of black garlic extract with amoxicillin against the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bacteria. The antibacterial synergy test was carried out by the microdilution checkerboard assay method, using a 48 wells microplate by calculating the fractional inhibition concentration index (FICI) value. The results showed that the value of minimum inhibitory concentration (MIC) of black garlic extract 20 mg/mL and MIC of amoxicillin >0.032 mg/mL, while the MIC value of combination of black garlic extract with amoxicillin remained 20 mg/mL, and the MIC value of combination of amoxicillin with black garlic extract remained >0.032 mg/mL. The interaction of the combination of black garlic extract with amoxicillin does not cause a decrease or increase in antibacterial activity compared to single use, with a FICI value of 2, so it can be concluded that the combination of black garlic extract with amoxicillin has no synergistic effect on *P. aeruginosa* ATCC 27853 bacteria.

Keywords: synergy, black garlic, *Allium sativum* L. amoxicillin, FICI, *Pseudomonas aeruginosa*

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Uraian Tanaman	4
II.1.1 Klasifikasi Bawang Putih	4
II.1.2 Morfologi Bawang Putih	5
II.1.3 Varietas Bawang Putih	6
II.2 Bawang Hitam	8
II.2.1 Pengolahan Bawang Hitam	8
II.2.2 Mekanisme Pembentukan Senyawa Kimia Bawang Hitam	8
II.2.3 Perbandingan Komposisi Kimia Bawang Hitam dan Bawang Putih	13

II.2.4 Manfaat Bawang Hitam	17
II.3 Ekstraksi	19
II.4 Uraian Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.	22
II.4.1 Grup <i>Pseudomonas</i>	22
II.4.2 Klasifikasi dan Morfologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
II.4.3 Patogenesis dan Resistensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
II.5. Antibiotika	25
II.5.1 Mekanisme Kerja Penisilin	26
II.5.2 Mekanisme Resistensi terhadap Penisilin	28
II.5.3 Amoksisilin	31
II.6. Metode Uji Aktivitas Antibiotika secara In Vitro	33
II.6.1 Metode Difusi	33
II.6.2 Metode Dilusi	35
BAB III METODE PENELITIAN	37
III.1 Alat dan bahan	37
III.2 Cara Kerja	37
III.2.1 Penyiapan Sampel	37
III.2.2 Ekstraksi Sampel	38
III.2.3 Sterilisasi Alat	38
III.2.4 Pembuatan Medium	39
III.2.5 Penyiapan Bakteri Uji	39
III.2.6 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)	40

III.2.6.1 Penentuan KHM Tunggal Ekstrak Bawang Hitam	40
III.2.6.2 Penentuan KHM Tunggal Amoksisilin	41
III.2.6.3 Penentuan KHM Kombinasi Ekstrak Bawang Hitam dengan Amoksisilin	42
III.2.7 Penentuan Nilai Konsentrasi Hambat Fraksional (FICI) Kombinasi Ekstrak Bawang Hitam dengan Amoksisilin	43
III.2.8 Analisis Data	44
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	45
IV.1 Ekstraksi	45
IV.2 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Tunggal Ekstrak Bawang Hitam	48
IV.3 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Tunggal Amoksisilin	51
IV.4 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kombinasi Ekstrak Bawang Hitam dengan Amoksisilin	53
IV.5 Penentuan Indeks Konsentrasi Hambat Fraksional (FICI)	53
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	58
V.1 Kesimpulan	58
V.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	66

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Perbandingan komposisi senyawa pada varietas bawang putih	7
2. Perbandingan komposisi senyawa antara bawang hitam dan bawang putih	15
3. Perbandingan komposisi senyawa pada varietas bawang hitam	17
4. Hasil rendemen ekstrak bawang hitam dengan metode <i>ultrasound assisted extraction</i> (UAE) menggunakan etanol 70%	46
5. Nilai KHM tunggal dan kombinasi ekstrak etanol bawang hitam dengan amoksisilin terhadap <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	49
6. Nilai FICI dari kombinasi ekstrak etanol bawang hitam dengan amoksisilin terhadap <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	54
7. Rata-rata nilai KHM tunggal dan kombinasi ekstrak etanol bawang hitam dengan amoksisilin	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Tanaman <i>Allium sativum</i> L.	4
2. Bawang putih tunggal	7
3. Bawang hitam	8
4. Skema jalur biokimia pembentukan senyawa organosulfur	12
5. Pewarnaan-Gram <i>P.aeruginosa</i> (perbesaran 1000x)	23
6. Struktur amoksisilin	31
7. Denah pengisian pada setiap sumuran	74
8. Hasil pengamatan sebelum penambahan TTC 1%	75
9. Hasil pengamatan setelah penambahan TTC 1%	75

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja umum	66
2. Skema penyiapan sampel dan ekstrak bawang hitam	67
3. Skema perhitungan pada ekstraksi bawang hitam	68
4. Skema pengenceran ekstrak bawang hitam dan amoksisilin	69
5. Skema penentuan KHM tunggal ekstrak bawang hitam	70
6. Skema penentuan KHM tunggal amoksisilin	71
7. Skema penentuan KHM dan FICI kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin	72
8. Komposisi medium	73
9. Denah pengisian pada penentuan nilai KHM tunggal dan kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin	74
10. Hasil penentuan nilai KHM ekstrak bawang hitam dan amoksisilin dengan metode <i>microdilution checkerboard assay</i>	75
11. Hasil penentuan rata-rata KHM tunggal dan kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin	76
12. Hasil perhitungan indeks konsentrasi hambat fraksional (FICI)	77

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Pseudomonas sp. merupakan bakteri Gram negatif yang mampu beradaptasi pada kondisi nutrisi dan oksigen yang rendah (Penna *et al.*, 2002). Bakteri ini terdiri atas berbagai spesies berbeda. Namun, spesies dari *Pseudomonas* yang paling sering menyebabkan infeksi pada manusia adalah *Pseudomonas aeruginosa* (Ghane and Azimi, 2014). *P.aeruginosa* merupakan bakteri patogen oportunistik yang menyebabkan infeksi pada manusia yang mengalami gangguan sistem imun. Bakteri ini termasuk salah satu dari enam patogen penyebab utama infeksi nosokomial yang terdiri dari *Enterobacter faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, dan *Enterobacter* spp. (ESKAPE). Bakteri patogen tersebut memiliki kemampuan untuk mengembangkan resistensi terhadap hampir semua antibiotika yang tersedia (Tummler, 2019).

P.aeruginosa secara intrinsik resisten terhadap beberapa antibiotika, termasuk golongan aminopenisilin seperti amoksisilin (Lupo *et al.*, 2018). Penelitian Ghane dan Azimi (2014) telah melaporkan prevalensi *P.aeruginosa* yang resisten terhadap amoksisilin sekitar 62% dari 52 isolat *P.aeruginosa* yang diisolasi di Rumah Sakit Iran Utara. Resistensi tersebut dapat diatasi melalui kombinasi amoksisilin dengan asam klavulanat. Namun, penelitian lain melaporkan bahwa *P.aeruginosa* juga telah resisten terhadap

amoksisilin/asam klavulanat dengan prevalensi sekitar 95% dari 102 isolat *P.aeruginosa multidrug resistant* (MDR) yang diisolasi di Rumah Sakit Pakistan (Ullah *et al.*, 2016).

Resistensi *P.aeruginosa* yang terus berkembang menyebabkan efek antibakteri amoksisilin untuk pengobatan infeksi semakin berkurang. Sementara itu, amoksisilin termasuk antibiotika yang memiliki kelebihan seperti absorpsi obat dalam saluran cerna yang lebih cepat dibandingkan golongan aminopenisilin lainnya (Brunton *et al.*, 2011). Oleh karena itu, perlu pendekatan alternatif lain untuk meningkatkan efek antibakteri amoksisilin, salah satunya melalui kombinasi antibiotika dengan tanaman obat yang berpotensi sebagai antibakteri. Pendekatan ini lebih efektif dibandingkan penggunaan antibiotika dosis tinggi yang dapat menyebabkan peningkatan efek samping (Bhardwaj *et al.*, 2016). Menurut penelitian Moussaoui dan Alaoui (2016) dan Stefanović (2018) bahwa beberapa tanaman obat yang dikombinasikan dengan antibiotika dapat memiliki efek sinergis yang mampu meningkatkan aktivitas antibakteri dari antibiotika yang bermanfaat pada pengobatan infeksi bakteri terutama bakteri yang telah resisten.

Salah satu tanaman obat yang berpotensi sebagai antibakteri adalah bawang hitam (*black garlic*). Bawang hitam merupakan produk olahan umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) pada suhu dan kelembaban terkontrol tanpa menggunakan bahan tambahan apapun. Bawang hitam mengandung senyawa organosulfur berupa *S-allylcysteine* (SAC) bersifat hidrofilik serta *diallyl sulfide* (DAS), *diallyl disulfide* (DADS), dan *diallyl trisulfide* (DATS)

yang bersifat hidrofobik (Ji-Hyeon and Dawon, 2017). Konsentrasi senyawa organosulfur yang terkandung dalam bawang hitam diketahui lebih tinggi dibandingkan bawang putih (Eun *et al.*, 2014; Ji-Hyeon and Dawon, 2017). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa organosulfur tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen, termasuk bakteri Gram negatif (Hossain *et al.*, 2014; Hyun-Joo *et al.*, 2018; Rose *et al.*, 2005). Namun, belum terdapat penelitian yang melakukan pengujian aktivitas antibakteri dari kombinasi bawang hitam dengan amoksisilin. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian pada bawang hitam yang dikombinasikan dengan amoksisilin untuk menghasilkan sinergitas yang dapat meningkatkan efek antibakteri amoksisilin sebagai antibiotika terhadap *P.aeruginosa*.

I.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah apakah terdapat efek sinergis dari kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sinergis dari kombinasi ekstrak bawang hitam dengan amoksisilin terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman

II.1.1 Klasifikasi Bawang Putih



Gambar 1. Tanaman *Allium sativum* L. (Sumber: Rukmana, 1995)

Klasifikasi tanaman bawang putih sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 2013):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Bangsa	: Liliales
Suku	: Liliaceae
Marga	: <i>Allium</i>
Jenis	: <i>Allium sativum</i> Linn.

Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan tanaman yang termasuk dalam bangsa *Liliales* atau *Liliiflorae* (Tjitrosoepomo, 2013). Tanaman ini memiliki beberapa nama lokal, yaitu: dason putih (Minang), bawang bodas (Sunda), kasuna (Bali), lasuna moputih (Minahasa), pia moputi (Gorontalo),

lasuna kebo (Makassar), dan bawa badudo (Ternate). Bawang putih umumnya tumbuh di dataran tinggi, namun varietas tertentu dapat tumbuh di dataran rendah. Suhu yang cocok untuk budidaya di dataran tinggi sekitar 20-25°C dengan curah hujan sekitar 1.200-2.400 mm pertahun, sedangkan suhu untuk budidaya di dataran rendah sekitar 27-30°C (Hernawan dan Setyawan, 2003).

II.1.2 Morfologi Bawang Putih

Bawang putih merupakan tanaman herba parenial yang membentuk umbi lapis. Tanaman ini termasuk bentuk terna (bergerombol) dan tumbuh tegak hingga mencapai ketinggian 30-75 cm. Batang bawang putih yang tumbuh di atas permukaan tanah merupakan batang semu yang tersusun dari pelepah-pelepah daun, sedangkan batang pokok tanaman ini sebenarnya merupakan batang pokok tidak sempurna (rudimenter) dengan pangkal atau bagian dasarnya berbentuk cakram. Akar terletak pada batang pokok di bagian dasar umbi atau pangkal umbi dengan sistem perakaran berupa akar serabut (monokotil). Bawang putih membentuk umbi lapis berwarna putih. Setiap umbi terdiri dari 8-20 siung yang dipisahkan oleh kulit tipis antara siung satu dengan siung lainnya (Hernawan dan Setyawan, 2003).

Bagian dasar umbi pada hakikatnya adalah batang pokok yang mengalami rudimentasi. Helaian daun bawang putih berbentuk pita dengan panjang dapat mencapai 30-60 cm dan lebar 1-2,5 cm. Setiap tanaman

memiliki jumlah daun 7-10 helai. Pelepah daun panjang merupakan satu kesatuan yang membentuk batang semu. Bunga bawang putih berupa bunga majemuk, bertangkai, berbentuk bulat, dan menghasilkan biji untuk keperluan generatif. Perhiasan bunga berupa tenda bunga dengan 6 tepala berbentuk bulat telur. Benang sari berjumlah 6 dengan panjang filamen 4-5 mm yang bertumpu pada dasar perhiasan bunga. Ovarium superior tersusun atas 3 ruangan (Hernawan dan Setyawan, 2003; Tjitrosoepomo, 2013).

II.1.3 Varietas Bawang Putih

Varietas bawang putih merupakan berbagai jenis bawang putih yang mempunyai perbedaan sifat atau ciri yang permanen seperti tinggi rendahnya tanaman, besar-kecilnya umbi, umur panen, jumlah dan ukuran siung, kandungan dalam umbi, serta iklim pertumbuhannya. Jenis bawang putih yang banyak ditanam di Indonesia terdapat tiga varietas yang dikenal unggul, yaitu lumbu hijau dan lumbu kuning untuk lahan dataran tinggi, serta lumbu putih untuk dataran rendah. Selain itu, juga terdapat varietas lain yang merupakan modifikasi dari ketiga varietas tersebut seperti bawang putih tunggal (Rukmana, 1995; Sandrakirana *et al.*, 2018).

Bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) merupakan varietas yang tumbuh dengan siung tunggal. Bawang putih tunggal hanya terdiri dari satu siung (*single bulb garlic*). Bawang putih dapat dibagi menjadi dua jenis berdasarkan jumlah siungnya, yaitu bawang putih yang memiliki banyak siung (*multi bulb garlic*) dan bawang putih tunggal yang hanya memiliki satu

siung (*single bulb garlic*). Karakteristik organoleptik antara bawang putih siung dan bawang putih tunggal memiliki perbedaan dari warna, rasa, dan bau. Bawang putih siung berwarna krim yang kekuningan, rasa yang tajam, bau yang khas, sedangkan bawang putih tunggal berwarna krim muda, rasa yang lebih kuat dan tajam, serta bau khas yang lebih kuat (Bharat *et al.*, 2014).



Gambar 2. Bawang putih tunggal (Sumber: Bharat *et al.*, 2014)

Tabel 1. Perbandingan komposisi senyawa pada varietas bawang putih

Senyawa Kimia	Bawang putih siung (<i>multiple-clove fresh garlic</i>)	Bawang putih tunggal (<i>single-clove fresh garlic</i>)
Gula total (mg/g)	83,70 ± 11,40	152,10 ± 9.70
Polifenol (mg/g)	0,97 ± 0,02	0,97 ± 0,02
Alliin (mg/g)	3,18 ± 0,05	3,38 ± 0,04
SAC (mg/g)	0,90 ± 0,07	1,00 ± 0,06

Sumber: Wang *et al.*, 2016

Komposisi senyawa juga bervariasi antara varietas bawang putih. Komposisi senyawa bawang putih yang bervariasi dipengaruhi oleh lokasi pertumbuhan bawang putih yang berbeda. Bawang putih tunggal memiliki kandungan gula total, senyawa *allin*, dan *S-allyl cysteine* (SAC) yang lebih tinggi daripada bawang putih siung. Perbandingan komposisi senyawa antara bawang putih tunggal dan bawang putih siung disajikan pada Tabel 1 (Wang *et al.*, 2016).

II.2 Bawang Hitam

II.2.1 Pengolahan Bawang Hitam

Bawang hitam (*black garlic*) merupakan hasil olahan dari umbi bawang putih utuh (*Allium sativum* L.). Bawang hitam diolah pada ruang dengan suhu dan kelembaban yang konstan selama lebih dari 10 hari tanpa menggunakan bahan tambahan apapun (Ji-Hyeon dan Dawon, 2017).

Secara umum pemanasan bawang putih menjadi bawang hitam menggunakan suhu 60°C-70°C dengan periode pemanasan 30 hari. Periode pengolahan bawang hitam tergantung pada penggunaan suhu. Periode hari akan lebih pendek jika digunakan suhu yang lebih tinggi. Bawang hitam umumnya dibuat pada kisaran suhu 40-90°C dengan kelembaban relatif 60-90%. Perbedaan suhu dan periode hari akan mempengaruhi konsentrasi senyawa aktif dalam bawang hitam. Bawang putih yang diolah pada suhu 70°C dengan kelembaban relatif 90% dapat menghasilkan bawang hitam sekitar 7, 14, 21, 28, dan 35 hari (Ji-Hyeon dan Dawon, 2017).



Gambar 3. Bawang hitam (Sumber: Miladulhaq, 2018)

II.2.2 Mekanisme Pembentukan Senyawa Kimia Bawang Hitam

Bawang putih mengandung air (62-68%), karbohidrat (26-30%), protein (1,5-2,1%), asam amino (1-1,5%), senyawa organosulfur (1,1-3,5%) dan

serat (1,5%), yang berdasarkan berat segar. *Fructan* adalah karbohidrat nonstruktural utama, sekitar 70-80% dari bahan kering bawang putih. Tidak terdapat pati ataupun anggota seri oligosakarida *raffinose* yang ditemukan pada bawang putih (Darbyshire & Henry, 1981).

Selama proses pemanasan (termal), bawang putih berangsur-angsur berubah warna dari putih menjadi coklat dan akhirnya menjadi warna hitam melalui reaksi kimia (reaksi *Maillard* dan *Browning*) yang disertai perubahan dalam komponen senyawa organosulfur (Ji-Hyeon dan Dawon, 2017). Proses termal memicu banyak reaksi kimia, seperti reaksi *Maillard*, reaksi karamelisasi, oksidasi kimia fenol, dan sebagainya (Capuano & Fogliano, 2011). Reaksi *Maillard* terutama terjadi selama pengolahan bawang hitam secara termal, yang merupakan reaksi pencoklatan secara nonenzimatik antara gula pereduksi dan asam amino. Hal ini menyebabkan perubahan warna, rasa, dan aroma pada bawang hitam. Selain itu, beberapa senyawa biologis juga terbentuk, yang mana awalnya tidak ada dalam bawang putih segar (Wang *et al.*, 2011).

Degradasi polisakarida juga terjadi selama perlakuan termal. Sakarida termasuk salah satu golongan senyawa terpenting dalam umbi bawang putih dan bawang hitam. Bawang putih segar tidak memiliki rasa manis. Namun, bawang hitam memiliki rasa manis sehingga dapat dimakan langsung karena adanya perubahan sakarida selama proses pemanasan. Sakarida dalam bawang putih segar sebagian besar adalah polisakarida. Namun setelah pengolahan secara termal, bawang hitam hampir tidak memiliki polisakarida

molekul tinggi. Sakarida dalam bawang putih segar terdegradasi dari molekul tinggi ke molekul rendah, yang berkontribusi pada akumulasi monosakarida.

Polisakarida akhirnya terdegradasi menjadi monosakarida, yang sebagiannya ikut serta dalam reaksi *Maillard*, dan sebagian lagi dikembangkan dengan rasa manis. Warna pada bawang putih sangat berubah akibat reaksi *Maillard*. Pengurangan kadar gula tergantung pada dua faktor selama proses termal. Di satu sisi, polisakarida dalam bawang putih terdegradasi menjadi gula pereduksi. Di sisi lain, gula pereduksi berkontribusi dalam reaksi *Maillard*. Perkembangan warna hitam terutama terkait dengan reaksi *Maillard*. Polisakarida terdegradasi tanpa hidrolisis enzim, dan inaktivasi enzim tidak mempengaruhi pembentukan warna dan akumulasi gula yang berkurang. Polisakarida dapat didegradasi menjadi oligosakarida atau monosakarida melalui perlakuan termal. Degradasi termal menyebabkan pemotongan rantai dari ikatan glikosidik polisakarida. Rantai panjang polisakarida terurai menjadi dua rantai kecil, dan pelepasan monosakarida dari ujung rantai, yang merupakan sumber utama gula pereduksi dan oligosakarida (Lu *et al.*, 2018).

Pada tanaman bawang putih mengandung lebih dari 100 komponen senyawa berbeda yang memiliki aktivitas biologis yang menguntungkan. Namun, dari komponen senyawa yang banyak tersebut terdapat senyawa yang paling penting, yaitu senyawa organosulfur. Senyawa organosulfur dalam bawang putih empat kali lebih banyak dibandingkan tanaman lainnya

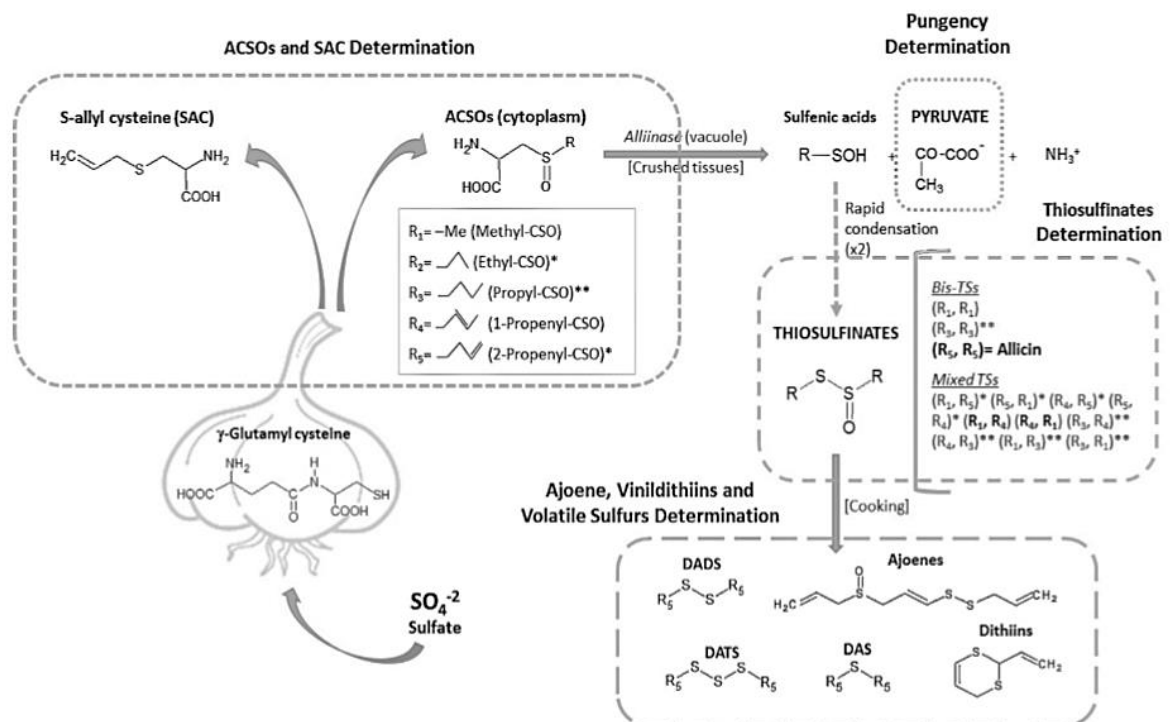
yang juga mengandung sulfur tinggi, seperti bawang merah, brokoli, dan kol (Garlic and Health Group, 2007).

Senyawa organosulfur (*organo-sulfur compounds*/OSC) terbentuk melalui dua jalur reaksi, yaitu jalur pembentukan *thiosulfinate* dan *S-allyl cysteine* (SAC). Jalur pembentukan *thiosulfinate* akan dihasilkan senyawa *allicin*, yang selanjutnya dari jalur ini akan dibentuk kelompok *allyl sulfide*, *dithiin*, *ajoene*, dan senyawa sulfur lainnya. Skema jalur produksi OSC dan transformasi selanjutnya disajikan pada Gambar 4 (Ramirez *et al.*, 2016).

Umbi bawang putih utuh mengandung senyawa *γ-glutamyl cysteine* yang merupakan senyawa intermediat biosintesis pembentukan senyawa organosulfur lainnya. Proses reaksi pemecahan *γ-glutamyl cysteine* berlangsung dengan bantuan enzim *γ-glutamyl transpeptidase* akan menghasilkan *alliin* atau *alk(en)yl cysteine sulfoxides* (ACSO) yang terletak di sitoplasma. Pada saat jaringan umbi bawang putih terganggu seperti diiris-iris atau dihaluskan dalam proses pembuatan ekstrak, enzim *allinase* (terletak di vakuola) menjadi aktif dan menghidrolisis *alliin* menghasilkan senyawa intermediat berupa *sulfenic acid*, *pyruvate*, dan ion NH_3^+ . Selanjutnya, dari reaksi hidrolisis enzimatik yang terjadi akan mengalami kondensasi cepat menghasilkan senyawa *thiosulfinate* (TS) dan *allicin*.

TS adalah molekul reaktif yang dapat mengalami sejumlah transformasi tergantung pada suhu, pH, dan pelarut medium. Reaksi-reaksi ini dapat menyebabkan terbentuk berbagai OSC lainnya, termasuk *diallyl*, *methyl*, *allyl*, dan *diethyl mono-*, *di-*, *tri-*, *tetra-*, *penta-*, dan *hexasulfide*, *vinyl*dithiins

dan (*E*)- dan (*Z*)-ajoene. Selain biosintesis TS melalui interaksi ACSO-*alliinase*, γ -glutamyl cysteine dikonversi menjadi SAC melalui jalur yang berbeda (Moulia *et al.*, 2018; Ramirez *et al.*, 2016).



Gambar 4. Skema jalur biokimia pembentukan senyawa organosulfur (Sumber: Ramirez *et al.*, 2016)

Komponen senyawa yang mengandung sulfur pada bawang hitam terbagi atas 2, yaitu senyawa yang bersifat hidrofilik dan hidrofobik. Senyawa hidrofilik terdiri dari senyawa turunan sistein (*cysteine*) seperti SAC, SAMC, *s-methylcysteine*, dan turunan *glutamyl-cysteine*. Senyawa hidrofobik terdiri dari *diallyl sulfide* (DAS), *diallyl disulfide* (DADS), dan *diallyl trisulfide* (DATS), *allyl-methyl-trisulfide*, *ditiins*, *ajoene*. Senyawa-senyawa tersebut berasal dari senyawa *allicin* yang banyak terdapat dalam bawang putih.

Allicin merupakan senyawa yang termostabil sehingga saat bawang putih dipanaskan menjadi bawang hitam maka *allicin* mengalami reaksi enzimatis yang akan menghasilkan senyawa organosulfur turunan berupa *allyl sulfide* (DAS, DADS, DATS), *dithiin*, *ajoene*, serta senyawa turunan lainnya yang lebih stabil terhadap panas (Hernawan dan Setyawan, 2003; Ji-Hyeon dan Dawon, 2017; Sasaki *et al.*, 2007). Selain senyawa organosulfur, bawang hitam juga diketahui mengandung flavonoid dan polifenol (Elosta *et al.*, 2017; Il-Sook *et al.*, 2014).

II.2.3 Perbandingan Komposisi Kimia Bawang Hitam dan Bawang Putih

Selama proses pemanasan, terdapat perubahan yang signifikan dalam komposisi kimia ketika bawang putih diolah secara termal menjadi bawang hitam. Berdasarkan pada kultivar bawang putih dan jenis teknologi pengolahannya, bawang hitam dapat memiliki kandungan gula pereduksi 30 hingga 80 kali lebih tinggi daripada bawang putih, yang mana hal ini menjelaskan rasa manis yang berbeda antara bawang hitam dan bawang putih (Zhang *et al.*, 2016). Zhang *et al.* (2015) melaporkan bahwa bawang hitam yang diperoleh secara termal mengandung komponen terutama terdiri dari fruktosa (57,14%), sukrosa (7,62%), dan glukosa (6,78%). Martínez-Casas *et al.* (2017) menemukan peningkatan fruktosa yang paling signifikan dari $0,38 \pm 0,06$ menjadi $44,73 \pm 4,41$ g/100 g DM (*dry matter*/bahan kering) dalam bawang hitam, serta peningkatan glukosa dari $0,21 \pm 0,02$ menjadi $2,51 \pm 0,24$ g/100 g DM.

Selain itu, juga terjadi perubahan pada melanoidin selama pengolahan. Melanoidin merupakan polimer berbasis karbohidrat dan mengandung nitrogen dengan warna coklat. Total melanoidin meningkat dari nol (tidak terdeteksi) ke tingkat signifikan, dengan peningkatan intensitas kecoklatan yang terjadi bersamaan. Peningkatan melanoidin secara bertahap menyebabkan penggelapan bawang putih hingga warna coklat tua atau hitam. Laju reaksi kecoklatan pada bawang putih terkait dengan suhu pemanasan dan kelembaban relatif. Kandungan melanoidin yang lebih tinggi dapat sangat mengubah sifat fisik dan kimia bawang hitam termasuk peningkatan aroma dan tekstur. Selama pengolahan bawang hitam, melanoidin diproduksi bersama dengan beberapa zat antara penting lainnya seperti tiofena, furan, dan pirazin, yang mana masing-masing menunjukkan aroma panggang, rasa manis, dan rasa karamel, yang memberikan bawang hitam memiliki rasa dan aroma yang lebih intens dan diinginkan (Qiu *et al.*, 2020).

Pada profil komponen volatil juga terdapat perbedaan yang signifikan antara bawang putih dan bawang hitam. Kandungan senyawa turunan dari *S-alk(en)yl-L-cysteine* dalam bawang hitam (<28% dari total konsentrasi relatif) berkurang sebanyak 42% dibandingkan dengan bawang putih (hingga 70% dari total konsentrasi relatif). *Allyl methyl sulfide* termasuk senyawa volatil paling berlimpah dalam bawang hitam (18,2%), diikuti oleh *allyl methyl trisulfide* (1,5%) dan *diallyl sulfide* (DAS; 1,4%). *Furfural* (rasa panggang) dan *benzeneacetaldehyde* (bau pahit almond) juga termasuk senyawa rasa yang

paling melimpah di bawang hitam (masing-masing hingga 17,3% dan 12%), yang mana senyawa tersebut tidak dapat dideteksi dalam bawang putih (Molina-Calle *et al.*, 2017). Volatil yang mengandung sulfur utama dalam bawang putih yang mengalami pengolahan pada suhu tinggi adalah DADS (12,89%), 1,5-dithiocane (10,40%), DAS (5,44%), dan *O-methyl-2-acetylhydrazinecarbothioate* (6,54%) (Kim *et al.*, 2011). Variasi dalam profil volatil antara bawang putih dan bawang hitam dimungkinkan karena perbedaan dalam varietas bawang putih, teknologi pemrosesan, dan metode analisis (Qiu *et al.*, 2020).

Perbedaan komposisi komponen kimia mempengaruhi kualitas bawang hitam yang dihasilkan, yang mana sangat tergantung pada proses pengolahan mulai dari suhu pemanasan, kelembaban, waktu atau periode pemanasan, matriks pH atau media pelarut, ataupun varietas dan karakteristik dari bawang putih itu sendiri (Qiu *et al.*, 2020). Pada Tabel 2 dirangkum perbandingan komposisi kimia antara bawang hitam dan bawang putih berdasarkan berbagai referensi yang berbeda. Pada Tabel 3 disajikan perbandingan komposisi kimia berdasarkan bawang hitam yang dihasilkan dari bawang putih dengan varietas yang berbeda.

Tabel 2. Perbandingan komposisi senyawa antara bawang hitam dan bawang putih

Referensi	Senyawa Kimia	Bawang Putih	Bawang Hitam	Metode Pengolahan Bawang Hitam
(Mun-Su <i>et al.</i> , 2012)	SAC ($\mu\text{g/g}$)	$245,35 \pm 1,35$	$522,51 \pm 1,19$	40 hari; 60-70°C; 85-95% RH; maserasi dengan metanol 30 menit
	DADS ($\mu\text{g/g}$)	$0,275 \pm 0,015$	$8,71 \pm 0,45$	
(Chung <i>et</i>	Total konten	$4,06 \pm 0,65$	$10,19 \pm 0,51$	3 hari; 80°C;

<i>al.</i> , 2020)	polifenol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)			75-90% RH; ekstraksi dengan air
	<i>Alliin</i> ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$753,96 \pm 16,88$	$411,10 \pm 29,17$	
	<i>S-methyl-cysteine</i> (SMC) ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$8.456,33 \pm 226,15$	$13.092,78 \pm 61,53$	
	<i>S-ethyl-cysteine</i> (SEC) ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$735,39 \pm 149,66$	$767,82 \pm 30,54$	
	SAC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$122,69 \pm 10,01$	$575,95 \pm 14,23$	
(Il-Sook <i>et al.</i> , 2014)	Polifenol total (mg GAE/g)	$13,91 \pm 1,62$	$58,33 \pm 1,90$	21 hari; 70°C; 90% RH
	Flavonoid total (mg RE/g)	$3,22 \pm 0,07$	$15,37 \pm 0,52$	
(Molina-Calle <i>et al.</i> , 2017)	<i>Allyl methyl sulfide</i> (%)	3,6	18,2	36 hari; 60-80°C
	<i>Dimethyl trisulfide</i> (%)	0,73	1,0	
	DAS (%)	4,8	1,4	
	<i>Furfural</i> (%)	-	17,3	
	<i>2,3-butanedione</i> (%)	-	0,91	
	<i>1-hydroxy-2-propanone</i> (%)	-	0,74	
(Zhang <i>et al.</i> , 2015)	<i>Allicin</i> (g/kg)	$3,18 \pm 0,11$	$1,85 \pm 0,07$	4 hari; 70-80°C; ekstraksi dengan air pada suhu 25-27°C
	<i>Allicin</i> (g/kg)	$3,18 \pm 0,11$	-	10 hari; 70-80°C; ekstraksi dengan air pada suhu 25-27°C
	<i>Alliin</i> (g/kg)	$11,28 \pm 0,22$	$2,31 \pm 0,07$	10 hari; 70-80°C; ekstraksi dengan air pada suhu 25-27°C
	Gula pereduksi (g/kg)	$5,80 \pm 0,11$	$318,30 \pm 4,23$	
	Polisakarida (%)	98,4	29,4	
	Monosakarida (%)	1,6	70,6	
	pH	6,25	4,25	
	<i>Melanoidin</i> (OD FM)	<0,1	Sekitar 1,8	10 hari; 50°C; 80% RH
(Yuan <i>et al.</i> , 2018)	pH	6,13	4,00	
(Bae <i>et al.</i> , 2014)	Kadar air (g/100 g)	66,1	45,3	45 hari; 85°C; 70% RH;

Intensitas kecoklatan (OD)	<0,1	2,05	ekstraksi panas dengan air
pH	6,42	3,05	
SAC ($\mu\text{g/g}$)	19,61	85,46	

Keterangan: GAE (gallic acid equivalents), setara asam galat; RE (rutin equivalents), setara rutin; OD (optical density), densitas optik untuk absorbansi pada 420 nm; FM (fresh matter), bahan segar.

Tabel 3. Perbandingan komposisi senyawa pada varietas bawang hitam

Komponen Kimia	Bawang hitam siung (multiple-clove black garlic)	Bawang hitam tunggal (single-clove black garlic)
Gula total (mg/g)	164,30 $\pm$ 14,30	194,20 $\pm$ 14,10
Polifenol (mg/g)	4,70 $\pm$ 0,14	5,63 $\pm$ 0,24
Alliin (mg/g)	1,52 $\pm$ 0,05	1,80 $\pm$ 0,08
SAC (mg/g)	3,51 $\pm$ 0,23	3,53 $\pm$ 0,14

Sumber: Wang *et al.*, 2016

II.2.4 Manfaat Bawang Hitam

Senyawa organosulfur tersebut memiliki aktivitas biologis salah satunya adalah aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen, termasuk strain bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik (Rose *et al.*, 2005). Menurut Avato *et al.* (2000) menunjukkan bahwa senyawa ajoene dan DADS memiliki aktivitas antibakteri berspektrum luas terhadap bakteri Gram negatif maupun bakteri Gram positif. Selain itu, menurut Wen-Hu *et al.* (2008) bahwa senyawa DADS dan DATS secara efektif dapat menghambat pertumbuhan beberapa patogen infeksi nosokomial termasuk *P.aeruginosa*. Komponen senyawa organosulfur diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar pada pertumbuhan bakteri fase log atau fase eksponensial, yaitu ketika bakteri aktif membelah diri sehingga jumlah populasi bakteri meningkat sangat

cepat. Efek antibakteri bergantung pada jumlah atom sulfur sehingga ketika jumlah atom sulfur dalam senyawa organosulfur meningkat (*diallyl sulfide*, *diallyl disulfide*, *diallyl trisulfide*) maka efek antibakteri juga meningkat. Pada bakteri Gram negatif, paparan senyawa organosulfur dapat mengakibatkan kerusakan morfologis bakteri, seperti hilangnya integritas struktural dinding sel, membran sel, dan matriks intraseluler. Senyawa-senyawa organosulfur tersebut diketahui dapat dengan bebas menembus membran sel dan bergabung dengan enzim yang mengandung protein (β -laktamase) sehingga mengubah strukturnya (Abbas *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2011). Selain itu, senyawa organosulfur juga dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri Gram negatif yang diproduksi sebagai perlindungan bakteri. Komposisi utama biofilm bakteri terdiri atas air dan zat polimer ekstraseluler (*extracellular polymeric substances*/EPS) yang diatur oleh *quorum sensing* (QS) sehingga QS ini memainkan peran penting dalam pembentukan biofilm bakteri. Senyawa organosulfur seperti ajoene, DAS, DADS, dan DATS memiliki efek penghambatan pada pembentukan biofilm bakteri termasuk *P.aeruginosa* dengan menghambat produksi faktor virulensi melalui regulasi *quorum sensing* (QS) tersebut (Nakamoto *et al.*, 2019; Park, 2018; Velliyagaunder *et al.*, 2012). Ekstrak bawang hitam dengan konsentrasi 5% dapat menghambat bakteri gram negatif maupun gram positif seperti *P.aeruginosa*, MRSA, *enteromargenic E.coli* serta fungi *Candida albicans* (Sasaki *et al.*, 2007). Selain senyawa organosulfur, flavonoid juga diketahui memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat

(disebabkan oleh penghambatan topoisomerase) dan metabolisme energi serta mengganggu dinding sel dan sintesis membran sel pada bakteri (Stefanović, 2018).

II.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penyarian zat aktif dari bagian tanaman untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bagian tanaman tersebut dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Harborne, 1987; Marjoni, 2016). Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Ditjen POM, 2000). Pelarut atau cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan diluar sel maka larutan konsentrasi tinggi akan keluar dari sel. Cairan penyari yang dapat digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol atau pelarut lain (Depkes RI, 1986). Beberapa metode ekstraksi bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan jenis senyawa yang diisolasi (Harborne, 1987).

Salah satu metode ekstraksi adalah *ultrasound assisted extraction* (UAE) atau sonikasi. Metode ini memanfaatkan bantuan gelombang ultrasonik dan telah banyak diterapkan dalam bidang kimia maupun industri makanan dan farmasi. Metode ini lebih unggul dibandingkan metode ekstraksi konvensional. Umumnya, metode ekstraksi konvensional

memerlukan waktu ekstraksi yang lama dan memiliki efisiensi rendah. Selain itu, banyak komponen senyawa aktif alami bersifat termolabil dan dapat mengalami degradasi selama ekstraksi termal. Penggunaan ultrasonik dalam ekstraksi dapat menghasilkan peningkatan ekstraksi dalam waktu yang lebih singkat meskipun pada kondisi suhu yang lebih rendah (Mandal *et al.*, 2015).

Gelombang ultrasonik merupakan gelombang suara dengan frekuensi antara 20 kHz hingga 500 MHz (Thompson and Doraiswamy, 1999). Ultrasonik yang ditransmisikan pada media cair akan menimbulkan getakan-getaran molekul yang secara bergantian menekan dan meregangkan struktur molekul media. Ultrasonik yang ditransmisikan ke dalam media cair menghasilkan siklus kompresi (tekanan tinggi) dan siklus ekspansi (tekanan rendah) secara bergantian, yang kecepatannya tergantung pada frekuensi getaran gelombang suara. Siklus kompresi (karena tekanan tinggi) menyatukan molekul, sedangkan siklus ekspansi (karena tekanan rendah) memisahkan molekul. Dalam cairan, siklus ekspansi menghasilkan tekanan negatif yang memaksa molekul menjauh satu sama lain. Jika intensitas ultrasonik cukup tinggi, siklus ekspansi dapat membuat gelembung atau rongga dalam cairan. Proses dimana gelembung-gelembung terbentuk dan pecah dikenal sebagai “kavitasi”. Frekuensi ultrasonik mempengaruhi ukuran gelembung yang terbentuk. Pada frekuensi yang lebih rendah (20 kHz), gelembung yang dihasilkan berukuran lebih besar dan ketika gelembung pecah, energi yang lebih tinggi dihasilkan. Pada frekuensi yang lebih tinggi,

pembentukan gelembung menjadi lebih sulit dan kavitasi tidak terjadi (Mandal *et al.*, 2015).

Pada proses ekstraksi, kavitasi yang dihasilkan dari gelombang ultrasonik menyebabkan pembengkakan dan hidrasi pada sel tanaman sehingga terjadi pembesaran pori-pori dinding sel dan melisiskan sel. Kavitasi juga akan memfasilitasi pelarut atau cairan penyari secara terus menerus untuk berpenetrasi ke dalam sel tanaman, meningkatkan terjadinya kontak yang lebih luas pada permukaan matriks tanaman dengan pelarut, dan meningkatkan proses difusi sehingga dapat mempercepat laju transfer massa dalam waktu singkat (Tabaraki and Nateghi, 2011; Vinatoru, 2001).

Pemanfaatan gelombang ultrasonik dapat dibedakan berdasarkan jenis ultrasonik, yaitu *cleaning bath ultrasonic*, *submersible transducers ultrasonic*, dan ultrasonik jenis probe. Pada *cleaning bath ultrasonic* dapat diterapkan secara langsung (*direct*) maupun tidak langsung (*indirect*). *Direct cleaning bath ultrasonic* dilakukan dengan dicelupkan probe ultrasonik ke dalam sampel sehingga tanpa adanya hambatan yang harus dilintasi oleh gelombang ultrasonik selain dari pelarut itu sendiri. Sementara itu, *indirect cleaning bath ultrasonic* dilakukan melalui dinding wadah sampel. Ultrasonik tidak langsung umumnya menggunakan bak ultrasonikasi. Gelombang ultrasonik perlu terlebih dahulu melintasi cairan di dalam perangkat ultrasonik (bak ultrasonikasi) kemudian dapat menyeberangi dinding wadah sampel. Hal tersebut dapat menghasilkan intensitas ultrasonikasi di dalam wadah sampel yang lebih rendah dari yang diharapkan. Ultrasonik tidak langsung

dapat digunakan untuk bahan yang mudah menguap sehingga wadah (erlenmeyer atau gelas beaker) perlu dilengkapi dengan penutup. Metode *indirect* sangat ideal untuk digunakan sebagai preparasi sampel (Santos *et al.*, 2009; Wardiyati, 2004).

II.4 Uraian Bakteri *Pseudomonas* sp.

II.4.1 Grup *Pseudomonas*

Pseudomonas merupakan kelompok bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, motil, bersifat aerobik dan beberapa di antaranya menghasilkan pigmen yang larut dalam air. *Pseudomonas* menghuni berbagai lingkungan yang beragam, seperti tanah, air, tanaman, dan hewan. Spesies *Pseudomonas* yang relevan secara klinis dapat dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan pada kemampuan menghasilkan pigmen fluoresens tertentu. Kelompok fluoresens *Pseudomonas* meliputi *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.monteilii*, *P.veronii*, dan *P.mosselii*. *Pseudomonas* yang termasuk dalam kelompok non-fluoresen meliputi *P.stutzeri*, *P.mendocina*, *P.alcaligenes*, *P.pseudoalcaligenes*, *P.luteola*, dan *P.oryzihabitan* (Riedel *et al.*, 2019).

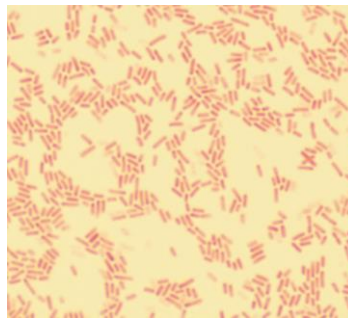
II.4.2 Klasifikasi dan Morfologi *Pseudomonas aeruginosa*

Berikut klasifikasi bakteri *P.aeruginosa* (Soedarto, 2015).

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria
Order : Pseudomonadales
Family : Pseudomonadaceae
Genus : Pseudomonas
Species : *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 5. Pewarnaan-Gram *P.aeruginosa* (perbesaran 1000x) (Sumber: Riedel et al., 2019)

P.aeruginosa adalah bakteri Gram-negatif berbentuk batang atau kokobasil dan berukuran sekitar $0,6 \times 2 \mu\text{m}$ dengan motilitas unipolar dan (*single polar flagellum*) yang aktif berenang dengan menggunakan flagelnya (Riedel et al., 2019; Soedarto, 2015).

P.aeruginosa dapat ditemukan hidup bebas di tanah, air, dan flora kulit. Bakteri ini juga banyak dijumpai di permukaan tanaman dan kadang-kadang hewan. Bakteri ini bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif yang mudah tumbuh di banyak jenis media kultur. Bakteri ini dapat tumbuh pada lingkungan tanpa oksigen jika terdapat NO_3 sebagai penerima elektron pernapasan (*respiratory electron acceptor*). *P.aeruginosa* dapat tumbuh pada suhu optimum 37°C , tetapi juga dapat tumbuh pada suhu setinggi 42°C . Selain itu, bakteri ini dapat hidup pada minyak diesel sehingga disebut

sebagai mikroorganisme pengguna hidrokarbon (*hydrocarbon-using microorganism-HUM bug*) yang menyebabkan terjadinya karat (*microbial corrosion*). *P.aeruginosa* tahan terhadap konsentrasi yang tinggi dari garam dan zat warna, antiseptik lemah dan berbagai jenis antibiotika (Riedel *et al.*, 2019; Soedarto, 2015).

II.4.3 Patogenesis dan Resistensi *Pseudomonas aeruginosa*

P.aeruginosa merupakan spesies yang dianggap sebagai patogen utama bagi manusia dibandingkan spesies lainnya dalam kelompok *Pseudomonas*. *P.aeruginosa* bersifat invasif dan toksigenik, menghasilkan infeksi pada pasien dengan pertahanan inang abnormal, dan merupakan patogen nosokomial yang penting.. Menurut data dari *National Healthcare Safety Network* (NHSN), *P.aeruginosa* saat ini termasuk patogen paling umum kelima yang terlibat dalam infeksi yang didapat di rumah sakit di Amerika Serikat (Riedel *et al.*, 2019).

P.aeruginosa secara intrinsik resisten terhadap banyak agen antimikroba dan dapat memperoleh resistensi tambahan terhadap banyak agen antimikroba lainnya melalui transfer gen horizontal dan/atau mutasi. Mekanisme yang bertanggung jawab untuk resistensi intrinsik termasuk berbagai pompa efluks *multidrug* (misalnya, yang mempengaruhi β -laktam, fluoroquinolon, makrolida, dan antibiotik lainnya), serta kromosom AmpC β -laktamase yang diinduksi (resistensi terhadap ampicilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulanat) dan sefalosporin generasi kedua, serta seftriakson

dan sefotaksim). Selain itu, resistensi *multidrug* telah menjadi masalah utama dalam pengelolaan infeksi yang didapat di rumah sakit dengan *P.aeruginosa* karena akuisisi kromosom β -laktamase, extended spectrum β -laktamase, karbapenemase, mutasi saluran porin, dan pompa efluks. Persentase isolat *P.aeruginosa* yang resisten multi-obat sangat bervariasi (<1% hingga > 50%) menurut wilayah dan negara (Riedel *et al.*, 2019).

II.5 Antibiotika

Antibiotika adalah senyawa kimia khas yang dihasilkan oleh mikroorganisme hidup termasuk turunan senyawa dan struktur analognya yang dibuat secara sintetik, dan dalam konsentrasi kecil mampu menghambat atau mematikan proses penting dalam kehidupan satu spesies atau lebih mikroorganisme lain. Salah satu antibiotika yang banyak dikembangkan untuk pengobatan infeksi bakteri adalah antibiotika β -laktam. Antibiotik β -laktam dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu turunan penisilin sefalosporin, dan β -laktam nonklasik. Turunan penisilin merupakan senyawa pilihan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram positif dan Gram negatif. Struktur dasar penisilin adalah nukleus yang terdiri dari cincin β -laktam (cincin tiazolidine) dan rantai samping. Struktur cincin inti, terutama cincin β -laktam sangat penting untuk aktivitas antibakteri. Rantai samping menentukan sebagian besar spektrum antibakteri dan sifat farmakologis dari setiap penisilin tertentu (Bennet *et al.*, 2020; Djide dan Sartini, 2016; Siswandono, 2016).

II.5.1 Mekanisme Kerja Penisilin

Mekanisme kerja antibiotika penisilin adalah penghambatan pada sintesis dinding sel bakteri. Bakteri mempunyai dinding sel yang merupakan suatu lapisan luar dan kaku yang khas untuk spesies bakteri. Struktur ini membungkus membran sitoplasma, mempertahankan bentuk dan integritas sel, serta mencegah lisis sel akibat tekanan osmotik yang tinggi. Dinding sel terdiri dari suatu ikatan-ikatan silang kompleks polimer polisakarida dan polipeptida yang disebut peptidoglikan (murein atau mukopeptida). Lapisan peptidoglikan merupakan makromolekul penting untuk kehidupan bakteri dan lapisan ini sebagai tempat kerja antibiotika pada dinding sel bakteri. Peptidoglikan memiliki peran dalam mempertahankan keutuhan dinding dan bentuk sel karena mempunyai kisi-kisi struktur melintang dan berhubungan sangat erat. Dinding sel bakteri Gram positif adalah lapisan substansial dengan ketebalan 50-100 molekul, sedangkan pada bakteri Gram negatif hanya setebal 1-2 molekul. Lapisan lipopolisakarida membran luar tidak ditemukan pada bakteri Gram positif, namun hanya terdapat pada bakteri Gram negatif. Penghambatan biosintesis peptidoglikan menyebabkan hilangnya kekuatan dan kekakuan dinding sel sehingga sel mengalami kematian (Katzung and Trevor, 2015; Siswandono, 2016).

Antibiotik penisilin bersifat inhibitor selektif terhadap dinding sel bakteri sehingga aktif hanya ketika bakteri sedang dalam fase pertumbuhan dan menyintesis dinding sel. Mekanisme kerja dimulai dari penisilin secara kovalen mengikat sisi aktif protein pengikat penisilin (penicillin-binding

protein/PBP). Hal ini menghambat reaksi transpeptidase, menghentikan sintesis peptidoglikan, dan menyebabkan kematian sel (Brunton *et al.*, 2018; Katzung and Trevor, 2015).

Pada tingkat molekul, mekanisme kerja penisilin ditunjukkan oleh serangan nukleofil dari gugus hidroksil serin enzim transpeptidase pada karbonil karbon cincin β -laktam yang bermuatan positif sehingga terjadi hambatan biosintesis peptidoglikan. Akibatnya dinding sel menjadi lemah dan karena tekanan turgor dari dalam maka dinding sel akan pecah atau lisis sehingga bakteri mengalami kematian. Pada bakteri Gram negatif seperti *E.coli* dan *P.aeruginosa*, antibiotik penisilin pertama-tama harus menembus membran terluar selubung bakteri secara difusi pasif melalui saluran yang terbentuk oleh pori protein. Setelah itu, penisilin masuk melalui dinding sel, melewati ruang periplasma dan mencapai sasaran, yaitu enzim serin protease yang terdapat pada membran terdalam (sitoplasma). Enzim inilah yang bertanggung jawab terhadap biosintesis dinding sel. Pengaruh pada biosintesis dinding sel merupakan kerja bakterisid utama dari antibiotik penisilin (Siswandono, 2016).

Berikut beberapa mekanisme penghambatan antibiotika golongan penisilin terhadap bakteri (Harvey dan Champe, 2013).

- 1) Protein pengikat penisilin: Penisilin menginaktifkan berbagai protein pada membran sel bakteri. Protein pengikat penisilin ini (PBP) adalah enzim bakteri yang terlibat dalam sintesis dinding sel dan dalam mempertahankan ciri morfologi bakteri sehingga tidak hanya mencegah

sintesis dinding sel tetapi juga menyebabkan perubahan morfologik atau pelisisian bakteri yang rentan. Jumlah PBP bervariasi tergantung dengan jenis organisme. Perubahan pada beberapa molekul target ini membuat organisme menjadi resistensi terhadap penisilin.

- 2) Penghambatan transpeptidase: Beberapa PBP mengkatalisis pembentukan ikatan silang antara rantai peptidoglikan. Penisilin menghambat reaksi yang dikatalisasi transpeptidase ini sehingga menghalangi pembentukan ikatan silang yang penting bagi keutuhan dinding sel.
- 3) Produksi otolisin: Banyak bakteri terutama kokus Gram positif menghasilkan enzim degradatif (otolisin) yang berperan dalam pembentukan ulang dinding sel bakteri normal. Dengan adanya penisilin, kerja degradatif otolisin berlanjut tanpa ada sintesis dinding sel. Jadi, efek antibakteri dari penisilin merupakan hasil dari penghambatan sintesis dinding sel dan penghancuran dinding sel yang ada oleh otolisin.

II.5.2 Mekanisme Resistensi terhadap Penisilin

Mekanisme terjadinya resistensi bakteri patogen terhadap antibiotika dapat terjadi karena resistensi secara alami (*innate*) atau dapatan (*acquired*) (Wibowo, 2015). Resistensi alami terhadap penisilin terjadi pada bakteri yang tidak memiliki dinding sel peptidoglikan atau memiliki dinding sel yang impermeabel untuk penisilin. Resistensi dapatan terhadap penisilin melalui

transfer plasmid (Harvey dan Champe, 2013). Adapun kategori-kategori bakteri resisten menurut Magiorakos *et al.* (2012) antara lain sebagai berikut.

- 1) *Multidrug resistant* (MDR), yaitu resistensi bakteri yang didefinisikan sebagai ketidaksensitifan bakteri terhadap paling tidak satu agen antibiotik dari tiga atau lebih kategori agen antibiotik.
- 2) *Extensively drug resistant* (XDR), yaitu resistensi bakteri yang didefinisikan sebagai ketidaksensitifitas bakteri terhadap paling tidak satu agen antibiotik dari semua kategori agen antibiotik kecuali satu atau dua kategori yang masih sensitif.
- 3) *Pan drug resistant* (PDR) yaitu resistensi bakteri yang didefinisikan sebagai ketidaksensitifan bakteri terhadap semua agen antibiotik dari semua kategori.

Pada mekanisme terjadinya resistensi terhadap antibiotik penisilin terdapat beberapa aktivitas, yaitu (Harvey dan Champe, 2013):

- 1) Aktivitas β -Laktamase: kelompok enzim ini menghidrolisis ikatan amida siklik dari cincin β -laktam yang menyebabkan hilangnya aktivitas bakterisida. Kelompok enzim tersebut menjadi penyebab utama resistensi terhadap penisilin. β -laktamase dapat dibentuk atau lebih sering didapat melalui transfer plasmid. Beberapa antibiotika penisilin termasuk substrat yang buruk untuk β -laktamase dan menahan pembelahan yang mengakibatkan terjadinya pertahanan aktivitas melawan bakteri penghasil β -laktamase membatasi enzim tersebut dalam ruang periplasma antara membran dalam dan luar.

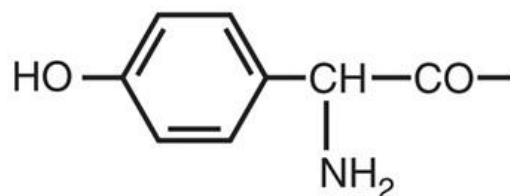
- 2) Penurunan permeabilitas terhadap obat: penurunan penetrasi penisilin melalui membran sel luar bakteri mencegah obat mencapai target PBP. Keberadaan pompa efluks (pompa aliran keluar) juga bisa mengurangi jumlah obat intraselular.
- 3) PBP yang berubah: PBP yang dimodifikasi memiliki afinitas yang lebih rendah untuk antibiotika penisilin yang menyebabkan konsentrasi obat yang tidak dapat mengobati secara klinis dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Menurut Katzung dan Trevor (2015), resistensi terhadap golongan penisilin disebabkan oleh satu dari empat mekanisme, yaitu: (1) inaktivasi antibiotik oleh β -laktamase, (2) modifikasi PBP sasaran, (3) gangguan penetrasi obat ke PBP sasaran, dan (4) pompa efluks. β -laktamase dari bakteri Gram negatif terletak di ruang periplasmik antara membran sitoplasma dalam dan membran luar sehingga secara strategis dapat melindungi target PBP dari paparan penisilin. Resistensi akibat gangguan penetrasi penisilin ke PBP sasaran terjadi hanya pada bakteri Gram negatif karena memiliki membran luar yang impermeabel, yang mana tidak terdapat pada bakteri Gram positif. Membran luar merupakan penghalang penting untuk penetrasi penisilin dan komponen penting resistensi. Penisilin menembus membran luar dan masuk ke bakteri Gram negatif melalui saluran protein membran luar yang disebut porin. Porin membatasi masuknya molekul ke dalam sel sesuai dengan ukuran, struktur, dan muatan. Penisilin dapat melewati porin ke ruang periplasmik dan mengikat untuk menargetkan

PBP. Tidak adanya saluran yang sesuai atau berkurangnya pembentukannya dapat sangat menghambat pemasukan penisilin ke dalam sel bakteri sehingga tidak dapat menargetkan PBP. Kurangnya penetrasi saja biasanya belum cukup untuk menghasilkan resistensi karena akhirnya cukup banyak antibiotik yang berhasil masuk ke sel untuk menghambat pertumbuhan. Bakteri Gram negatif juga dapat membentuk suatu pompa efluks yang terdiri dari komponen-komponen protein sitoplasma dan periplasma yang secara efisien mengangkut sebagian dari antibiotik penisilin dari periplasma kembali keluar menembus membran plasma sebelum antibiotik dapat berkerja (Bennet *et al.*, 2020; Katzung and Trevor, 2015).

Mekanisme resistensi pada bakteri Gram negatif umumnya melalui inaktivasi oleh β -laktamase. Resistensi pada bakteri *P.aeruginosa* tidak hanya melalui inaktivasi β -laktamase, namun disertai dengan berkurangnya permeabilitas membran luar dan penambahan pompa efluks (Bennet *et al.*, 2020).

II.5.3 Amoksisilin



Gambar 6. Struktur amoksisilin (Sumber: Bennet *et al.*, 2020)

Amoksisilin atau *D(-) α -amino-p-hydroxybenzylpenicillin* merupakan salah satu antibiotika turunan penisilin semi sintetis yang digunakan untuk

pengobatan infeksi pada saluran nafas, saluran empedu dan saluran kemih, gonorhu, gastroenteritis, dan meningitis. Amoksisilin pada umumnya bersifat bakterisidal untuk bakteri Gram positif dan Gram negatif (spektrum luas). Obat ini stabil dalam asam dan dirancang untuk penggunaan oral. Amoksisilin diserap lebih cepat di saluran GI daripada ampisilin. Konsentrasi plasma puncak amoksisilin 2 sampai 2,5 kali lebih besar daripada ampisilin setelah pemberian oral dengan dosis yang sama yang tercapai pada 2 jam dengan rata-rata 4 µg/mL ketika 250 mg diberikan. Makanan tidak mengganggu penyerapan obat ini. Meskipun waktu paruh amoksisilin mirip dengan ampisilin, konsentrasi efektif amoksisilin yang diberikan secara oral dapat dideteksi dalam plasma dua kali lebih lama dibandingkan ampisilin. Sebagian besar dosis amoksisilin diekskresikan dalam bentuk aktif melalui urin (Brunton *et al.*, 2018; Siswandono, 2016).

Amoksisilin termasuk dalam golongan aminopenisilin. Golongan aminopenisilin memperluas spektrum aktivitas penisilin G dalam arah yang berbeda dari penisilin yang resisten terhadap penisilinase yang memungkinkan aktivitas untuk melawan beberapa organisme Gram negatif. Namun, kini aminopenisilin rentan terhadap β -laktamase dari bakteri Gram positif dan Gram negatif sehingga perluasan lebih lanjut dari aktivitas aminopenisilin dimungkinkan melalui koformulasi dengan inhibitor β -laktamase (Brunton *et al.*, 2018).

β -laktamase merupakan enzim yang dapat menginaktifkan antibiotika golongan penisilin. Sementara itu, inhibitor β -laktamase adalah senyawa

yang dapat menetralkan enzim β -laktamase sehingga mencegah penginaktifan penisilin, misalnya asam klavulanat, asam olivanat, sulbaktam, dan pivsulbaktam. Inhibitor β -laktamase sering digunakan bersama-sama dengan penisilin untuk mengatasi infeksi bakteri yang telah resisten, seperti pada asam klavulanat yang diformulasikan dalam kombinasi amoksisilin (Bennet *et al.*, 2020; Siswandono, 2016).

II.6 Metode Uji Aktivitas Antibakteri secara *In Vitro*

II.6.1 Metode Difusi

1. Metode Difusi-Disk Agar

Pada metode ini, pelat agar diinokulasi dengan inokulum standar dari mikroorganisme uji. Kemudian, cakram disk (berdiameter sekitar 6 mm) yang mengandung senyawa uji ditempatkan pada permukaan agar. Cawan petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai. Secara umum, agen antimikroba berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji dan kemudian diameter zona hambat (Balouiri *et al.*, 2016).

2. Metode Gradien Antimikroba (Etest)

Metode gradien antimikroba menggabungkan prinsip metode pengenceran dengan metode difusi untuk menentukan nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) yang didasarkan pada gradien konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam media agar. Pada metode ini, strip yang diresapi dengan peningkatan gradien konsentrasi agen antimikroba dari satu ujung ke ujung lainnya diendapkan pada permukaan agar yang sebelumnya

diinokulasi dengan mikroorganisme yang diuji. Metode ini juga dapat dilakukan untuk menyelidiki interaksi antimikroba antara dua obat dengan cara strip *Etest* diresapi dengan antibiotik pertama, ditempatkan pada permukaan pelat agar diinokulasi. Setelah satu jam, strip diangkat dan diganti dengan yang lain diresapi dengan antibiotik kedua. Sinergi terdeteksi oleh penurunan MIC kombinasi oleh setidaknya dua pengenceran dibandingkan dengan antibiotik yang paling aktif diuji sendiri. Setelah diinkubasi, indeks konsentrasi hambat fraksional (*Fractional Inhibitory Concentration Index/FICI*) dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Balouiri *et al.*, 2016):

$$FIC_1 = \frac{\text{KHM ekstrak kombinasi antibiotika}}{\text{KHM ekstrak}}$$

$$FIC_2 = \frac{\text{KHM antibiotika kombinasi ekstrak}}{\text{KHM antibiotika}}$$

$$FICI = FIC_1 + FIC_2$$

Berikut penjabaran efek interaksi *in vitro* (Balouiri *et al.*, 2016).

- 1) Nilai FICI kurang dari atau sama dengan ($\leq$) 0,5, menunjukkan efek sinergis antibakteri.
- 2) Jika nilai FICI lebih besar dari ($>$) 0,5 dan kurang dari atau sama dengan ($\leq$) 1, menunjukkan efek aditif sebagai antibakteri.
- 3) Jika nilai FICI lebih besar dari ($>$) 1 dan kurang dari atau sama dengan ($\leq$) 4, menunjukkan efek indifereen sebagai antibakteri.
- 4) Jika nilai FICI lebih besar ($>$) 4, menunjukkan efek lebih lemah sebagai antibakteri (antagonis).

II.6.2 Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan metode yang paling tepat untuk penentuan nilai MIC karena memungkinkan untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam dilusi padat atau dilusi cair (*macrodilution* atau *microdilution*). Nilai MIC yang diperoleh didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang diuji yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji. Berikut uraian dari jenis-jenis metode dilusi (Balouiri *et al.*, 2016).

1. Metode Dilusi Cair

Mikrodiusi atau makrodlusi merupakan salah satu metode pengujian kerentanan mikroba yang paling dasar. Metode ini melibatkan seri konsentrasi agen antimikroba dua kali konsentrasi dari pengenceran sebelumnya (misalnya 1, 2, 4, 8, 16 dan 32 mg/mL) dalam media cair dengan menggunakan tabung yang berisi volume minimum 2 mL (makrodilusi) atau volume yang lebih kecil dengan menggunakan well microplate plat 96 (mikrodilusi). Setiap tabung atau well microplate diinokulasikan mikroba dengan standar *McFarland* 0,5 yang dibuat dalam media yang sama. Setelah pencampuran, dilakukan inkubasi pada kondisi yang sesuai. Selain itu, metode kolorimetrik juga sering digunakan dalam menentukan titik akhir KHM antibakteri dan antifungi dengan cara penggunaan indikator warna seperti garam tetrazolium. Penentuan Konsentrasi Bakterisida Minimal (KBM) merupakan perkiraan aktivitas bakterisidal atau fungisidal yang paling umum. KBM didefinisikan sebagai

konsentrasi terendah dari zat antimikroba yang dibutuhkan untuk membunuh 99,9% inokulum setelah inkubasi selama 24 jam dengan kondisi yang telah terstandarisasi. KBM dapat ditentukan setelah dilakukannya makrodilusi atau mikrodilusi dengan cara sub-kultur sampel dari tabung atau well. KBM menghasilkan pertumbuhan mikroba yang negatif setelah inkubasi 24 jam pada permukaan media agar nonselektif untuk menentukan jumlah sel bertahan (CFU/mL).

2. Dilusi padat

Metode ini dilakukan dengan cara mencampurkan zat antimikroba dengan media agar yang masih cair pada konsentrasi campuran yang diinginkan dengan menggunakan pengenceran dua kali lipat. Setelah itu, dilakukan inokulasi mikroba uji pada permukaan media agar. Titik akhir MIC dideteksi sebagai konsentrasi terendah dari zat antimikroba yang benar-benar menghambat pertumbuhan mikroba setelah inkubasi pada kondisi yang sesuai. Metode ini cocok untuk pengujian kepekaan antibakteri. Dilusi padat sering direkomendasikan sebagai metode standar untuk mikroorganisme anaerob dan *Helicobacter*.