

Research Article

Kemampuan Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum L.*) dalam Menghambat Perlekatan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Garlic (Allium sativum L.) Ethanolic Extract Capability to Inhibit Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation

Lisa Gosal¹, Suryani Hutomo^{2*}, Christiane M Sooi³

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta

² Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta

³ Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta

*Penulis korespondensi

Email: suryanihutomo_drg@yahoo.com

Received: November 25, 2020

Accepted: February 21, 2021

Abstrak

Ekstrak bawang putih (*Allium sativum L.*) diketahui mengandung zat yang dapat menghambat perlekatan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi kemampuan ekstrak bawang putih dalam menghambat perlekatan bakteri *P.aeruginosa*. Ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum L.*) dibuat menggunakan metode maserasi. Uji anti perlekatan dilakukan dengan menggunakan metode *static microtiter biofilm assay* pada *96-well plates*. Bakteri dikultur dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang telah diberi ekstrak bawang putih dalam berbagai konsentrasi. Biofilm yang terbentuk pada dinding *plate* diwarnai dengan Kristal violet 0,1% dan dilepas menggunakan etanol 96%, kemudian dibaca menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan nilai densitas optik sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Data dianalisis menggunakan *One-way ANOVA* didapatkan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan perbedaan yang bermakna antar konsentrasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum L.*) terhadap penghambatan *P. aeruginosa* dari konsentrasi 156,25 $\mu\text{g/ml}$ sampai pada konsentrasi 10000 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi terendah yang penghambatannya paling maksimal didapatkan pada penelitian ini adalah 156,25 $\mu\text{g/ml}$. Simpulan, ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum L.*) mampu menghambat perlekatan *P. aeruginosa*.

Kata kunci : Ekstrak etanol bawang putih; *Pseudomonas aeruginosa*; perlekatan.

Abstract

Garlic extract (Allium sativum L.) is known to contain substances that can inhibit bacterial adhesion. This study aims to explore the ability of garlic (Allium sativum L.) extract to inhibit the adhesion of P. aeruginosa. Ethanolic garlic (Allium sativum L.) extract was made by the maceration method. A bacterial adherence assay was performed used the static microtiter

Research Article

biofilm assay method on 96-well plates. Pseudomonas aeruginosa was inoculated in added garlic (Allium sativum L.) extract to brain heart infusion (BHI) broth in various concentrations. Biofilm bacteria on wall plates were stained with 0.1% Crystal violet and were extracted using 96%, subsequently were measured using a microplate reader with absorbance at 595 nm. Decreased optical density value equal with increased extract concentration. Statistical analysis using One-way ANOVA revealed a significant difference in the optical density (OD) value between the groups ($p < 0.05$). The minimum concentration obtained in this study was 156.25 $\mu\text{g/ml}$. Conclusion, ethanolic garlic (Allium sativum L.) extract can inhibit adherence to P. aeruginosa.

Keywords: Garlic ethanolic extract; *Pseudomonas aeruginosa*; adherence.

Pendahuluan

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif yang bersifat aerob, tersebar luas di alam serta dapat tumbuh baik pada suhu 37 – 42°C.¹ Bakteri ini juga dapat ditemukan di lingkungan lembab di rumah sakit seperti wastafel, toilet, alat bantu pernapasan mekanis, dan peralatan dialisis.² Bakteri *P. aeruginosa* merupakan patogen oportunistik yang dapat menginfeksi individu yang mengalami penurunan imunitas seperti pasien luka bakar, neutropenia, dan *cystic fibrosis*. Pili dan flagella merupakan struktur pada permukaan bakteri *P. aeruginosa* yang memediasi motilitas dan perlekatan terhadap sel host.^{1,3}

Bakteri *P. aeruginosa* dapat menjadi resisten dan bermultiplikasi terhadap desinfektan dan antiseptik yang biasa digunakan di rumah sakit sehingga menjadi salah satu penyebab infeksi nosokomial.⁴ Bakteri ini juga resisten terhadap banyak antimikroba sehingga tidak dianjurkan menggunakan monoterapi sebagai terapi untuk bakteri ini.^{2,3} Multi-resistensi pada *P. aeruginosa* menjadi alasan pentingnya dilakukan penelitian untuk menemukan metode baru terhadap potensi herbal.

Patogenesis *P. aeruginosa* diawali dengan masuknya bakteri ke dalam tubuh melalui membran mukosa saluran pernapasan, saluran pencernaan, genital dan saluran kemih. Infeksi bakteri juga dapat melalui membran mukosa dan kulit pada luka terbuka dan luka bakar. Perlekatan bakteri merupakan salah satu faktor virulensi yang difasilitasi oleh 4 komponen yaitu pili, flagella, lipopolisakarida (LPS), dan alginat. Lipid A yang merupakan komponen dari LPS berperan dalam aktivitas endotoksin. Alginat adalah eksopolisakarida mukoid yang membentuk kapsul pada permukaan bakteri berfungsi sebagai antifagositik.^{1,3,5}

Bawang putih (*Allium sativum L.*) merupakan salah satu jenis rempah-rempah yang mudah dijumpai di Indonesia. Dilaporkan bahwa tanaman ini memiliki banyak manfaat bagi kesehatan yaitu sebagai antimikroba, antijamur, antioksidan, antitumor, dan memiliki efek

Research Article

protektif pada sistem kardiovaskular. Aktivitas antimikroba bawang putih memiliki spektrum luas sehingga efektif terhadap bakteri Gram negatif maupun Gram positif.^{6,7,8}

Bawang putih memiliki berbagai macam jenis salah satunya bawang putih tunggal. Bawang putih yang digunakan merupakan bawang putih yang hanya memiliki 1 umbi. Hal ini dipengaruhi tempat tumbuh bawang putih yang tidak sesuai. Bawang putih tunggal karena hanya memiliki 1 umbi berpengaruh pada kandungan organosulfur di dalamnya.⁹ Menurut Adhuri dkk (2018) bahwa terdapat perbedaan potensi antimikroba ekstrak bawang putih tunggal dan ekstrak bawang putih majemuk terhadap bakteri Gram negatif. Pada penelitian tersebut, ekstrak bawang putih tunggal memiliki keunggulan bila dibandingkan dengan ekstrak bawang putih majemuk.

Senyawa yang terdapat dalam bawang putih adalah senyawa organosulfur dan senyawa organik. Senyawa organosulfur berupa *allicin* dan *ajoene* bersifat tidak stabil dan tidak tahan panas, merupakan komponen sulfur bioaktif utama dimana hanya akan terbentuk apabila bawang putih dihancurkan atau dipotong. *Allicin*, akan terbentuk ketika bagian umbi pada bawang putih dihancurkan sehingga mengaktifasi enzim allinase dan menghidrolisis *alliin* dan menghasilkan senyawa intermediet asam sulfenat, piruvat dan NH_3^+ .^{11,12}

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana dan telah mendapatkan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana dengan nomor 1136/C.16/FK/2020.

Persiapan Ekstrak

Bawang putih didapatkan dari Merapi Herbal Farma Yogyakarta dengan nomor surat 20/06/MFH/2019. Ekstrak etanol bawang putih dibuat dari 1 kg bawang putih yang sudah dicuci dan dipotong kecil-kecil menggunakan metode maserasi berdasarkan modifikasi penelitian terdahulu.¹³ Bawang putih ditumbuk halus kemudian direndam di dalam larutan etanol 96% dengan perbandingan bawang putih dan etanol 1:10. Larutan diaduk selama 30 menit dan dibiarkan dalam wadah tertutup selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan disaring, filtrat bawang putih direndam dalam etanol 96% kembali, direndam kembali selama 24 jam dan diulang sebanyak 3 kali. Cairan kemudian ditampung dan dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporator*. Substrat diletakkan dalam *waterbath* (Memmert) pada suhu 70°C sehingga etanol menguap dan didapatkan ekstrak berbentuk pasta. Ekstrak diencerkan dengan dimethyl sulfoxide 1% (DMSO, Merck, Germany) untuk mendapatkan konsentrasi 10000 µg/ml sebagai stok.

Research Article

Persiapan bakteri

Pseudomonas aeruginosa didapat dari isolat klinik pasien RS Bethesda Yogyakarta dan telah diidentifikasi dengan metode *semi-automatic* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.¹⁴ Bakteri dikultur dalam *brain heart infusion broth* (BHI) cair (OXOID CM1135, Basingstoke, Hampshire, UK) dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24 jam. Kultur disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan diresuspensi dengan penambahan pepton sampai kekeruhan setara dengan McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml).¹⁴

Uji anti perlekatan

Uji anti perlekatan menggunakan metode *static microtiter biofilm assay* berdasarkan modifikasi penelitian terdahulu.¹⁴ 10 µl dengan berbagai konsentrasi (10000 µg/ml, 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,25 µg/ml, 78,125 µg/ml, 39,0625 µg/ml) ditambahkan pada 80 µl BHI pada *96-well plate* pada suhu ruang. Selama 30 menit kemudian 10 µl *P. aeruginosa* 0,5 McFarland diinokulasikan kedalam *96-well plate* (Iwaki). Sebagai kontrol negatif bakteri dikultur dalam BHI tanpa penambahan ekstrak. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C Setelah diinkubasi, media dibuang dan dicuci menggunakan *phosphate-buffered saline* (PBS) dan difiksasi menggunakan methanol absolut selama 15 menit. *Plate* kemudian dicuci dan ditambahkan Kristal violet 0,1% selama 10 menit pada suhu ruang. *Plate* dicuci kembali menggunakan PBS sebanyak 3 kali untuk membuang bakteri yang tidak melekat dan sisa cat. Biofilm dilepas menggunakan 100 etanol 96% dan dibaca menggunakan *microplate reader* (Thermo scientific, USA) dengan panjang gelombang 595 nm.

Analisis statistik

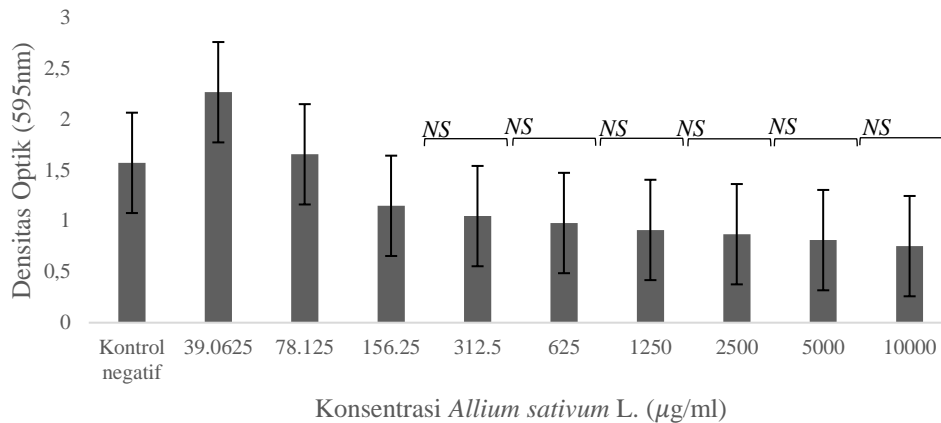
Uji statistik menggunakan *One-way ANOVA*. Data signifikan secara statistik pada $p < 0,05$. Data representatif dari 3 kali pengulangan penelitian.

Hasil

Penghambatan perlekatan bakteri dimulai pada konsentrasi 156,25 µg/ml yang ditandai dengan penurunan nilai densitas optik. Penurunan nilai densitas optik terjadi hingga konsentrasi 10000 µg/ml. Pada konsentrasi 39.0625 µg/ml dan 78.125 µg/ml belum terjadi penghambatan

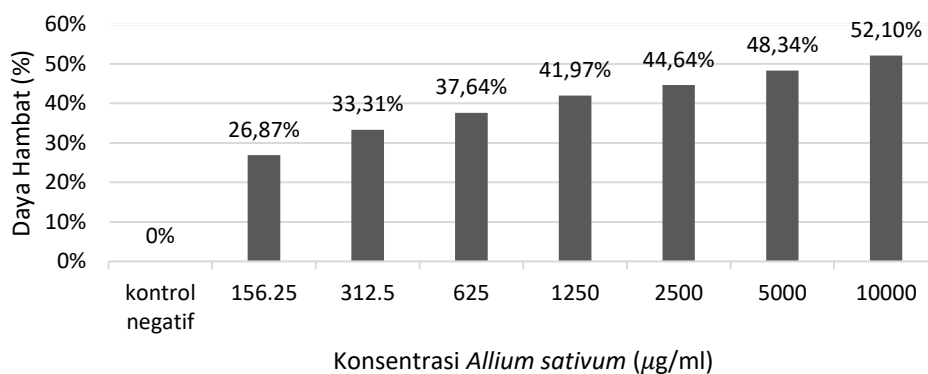
Research Article

perlekatan. Nilai densitas optik optik biofilm *P.aeruginosa* setelah terpapar ekstrak etanol bawang putih terangkum pada Gambar 1.



Gambar 1 Grafik Rerata dan Standar Deviasi Nilai Densitas Optik Biofilm *P. aeruginosa* setelah Terpapar Ekstrak Etanol Bawang Putih.

Besarnya persentase penghambatan biofilm *P.aeruginosa* oleh ekstrak bawang putih dihitung dengan rumus $\frac{\{\overline{OD} \text{ kontrol}(-) - \overline{OD} \text{ sampel}\}}{\overline{OD} \text{ kontrol}(-)} \times 100\%$. Penghambatan terkecil terjadi pada konsentrasi 156,25 µg/ml sebesar 26,87%. Besarnya persentase penghambatan biofilm tercantum pada Gambar 2.



Gambar 2 Presentase Daya Hambat pada *P. aeruginosa* setelah Terpapar Ekstrak Etanol Bawang Putih

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan *One-way ANOVA*, didapatkan nilai $p = 0.000$, $p < 0,05$, menunjukkan terdapat perbedaan bermakna (Tabel 2). *Post-Hoc multiple*

Research Article

comparison dilakukan untuk melihat perbedaan *rerata* antar kelompok. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar 156,25 µg/ml, 312,5 µg/ml, 625 µg/ml, 1250 µg/ml, 2500 µg/ml, 5000 µg/ml, 10000 µg/ml (Gambar 1) sehingga konsentrasi ekstrak bawang putih terendah yang penghambatannya paling maksimal yang dapat menghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa* adalah 156,25 µg/ml.

Diskusi

Ekstrak etanol bawang putih dapat menghambat perlekatan *P. aeruginosa* pada konsentrasi 156,25 µg/ml yang ditandai dengan penurunan nilai densitas optik. Penurunan nilai densitas optik terjadi hingga konsentrasi 10000 µg/ml. Hasil ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan Lihua dkk (2013) yang melaporkan bahwa *allicin* mampu menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat perlekatan pada *P.aeruginosa* dan menurunkan sekresi eksopolisakarida pada konsentrasi 128 µg/ml. Dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Wu dkk (2015) pada bakteri Gram positif, *Staphylococcus epidermidis*, didapatkan ekstrak etanol bawang putih pada konsentrasi 1,56 µg/ml mampu menghambat perlekatan. Dengan demikian ekstrak etanol bawang putih dapat menghambat perlekatan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Efek antimikroba pada bawang putih disebabkan karena senyawa organosulfur yang terkandung didalamnya yaitu *allicin* dan *ajoene*. *Allicin* merupakan salah satu kandungan organosulfur yang dihasilkan oleh bawang putih ketika bawang putih dipotong atau dihancurkan. Senyawa ini merupakan antimikroba alami yang memiliki berbagai mekanisme yaitu memediasi sel sehingga menyebabkan perubahan profil lipid pada membran sel, menghambat sintesis RNA bakteri secara total dan menghambat sintesis DNA secara parsial, menurunkan perlekatan dan menghambat sekresi eksopolisakarida pada proses pembentukan biofilm pada bakteri *P. aeruginosa* sehingga biofilm yang terbentuk lebih tipis dan mudah lepas, dan secara signifikan menyebabkan *down-regulation* pada faktor virulensi yang diekspresikan oleh *P. aeruginosa* seperti eksotoksin A dan elastase, serta menghambat secara total produksi rhamnolipid dan piperdon dan menghambat *quorum sensing*. *Ajoene* merupakan komponen organosulfur pada bawang putih yang juga memiliki sifat antimikroba namun memiliki daya yang lebih rendah dibandingkan dengan *allicin*. *Ajoene* merupakan inhibitor *quorum sensing* selain *allicin* yang diketahui menyebabkan *down-regulation* pada ekspresi gen *rhlA* yang berperan dalam sintesis rhamnolipid bakteri.^{15,17}

Research Article

Bawang putih selain memiliki senyawa organosulfur, juga senyawa organik yang diketahui memiliki efek sebagai antimikroba yaitu minyak atsiri dan *flavonoid*. Aktivitas antimikroba minyak atsiri disebabkan karena komponen di dalamnya yaitu *diallyl disulfide*, *diallyl trisulfide*, *diallyl tetrasulfide*, *allyl methyl trisulfide*, dan *diallyl sulfide*.¹⁸ Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Benmeziiane dkk (2017) melaporkan secara *in vitro* minyak atsiri memiliki efek antimikroba terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif. Mekanisme aktivitas antimikroba minyak atsiri dan *flavonoid* yaitu menghambat sintesis asam nukleat, perubahan fungsi membran sitoplasma, penghambatan metabolisme energi, penurunan perlekatan sel dan pembentukan biofilm, penghambatan porin pada membran sel, dan mengubah permeabilitas membran sel.²⁰ Menurut Manner dan Fallarero (2014) *flavonoid* merupakan inhibitor *quorum sensing* dan menghambat motilitas pada bakteri *P.aeruginosa* sehingga terjadi penghambatan pembentukan biofilm. Dengan demikian diperkirakan senyawa *allicin*, *ajoene*, minyak atsiri, dan *flavonoid* pada bawang putih yang menghambat perlekatan. Perlekatan bakteri merupakan salah satu faktor virulensi dan langkah pertama yang terjadi ketika *P. aeruginosa* mencapai mukosa *host*. Semua faktor virulensi *P.aeruginosa* harus bekerja bersama-sama untuk dapat menyebabkan penyakit. Dengan dihambatnya perlekatan, maka pembentukan biofilm *P. aeruginosa* terhambat. Berdasarkan hasil penelitian bawang putih dapat menghambat perlekatan, maka bawang putih dapat dikembangkan sebagai sediaan anti biofilm.

Simpulan

Ekstrak etanol bawang putih dapat menghambat perlekatan *P. aeruginosa*. Konsentrasi optimum yang didapatkan pada penelitian ini adalah 156,25 $\mu\text{g/ml}$ dengan daya hambat sebesar 26,87%. Potensi penghambatan perlekatan terus meningkat seiring kenaikan konsentrasi.

Daftar Pustaka

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. In: Pseudomonads, Acinetobacters, & Uncommon Gram-Negative Bacteria. 25th ed. Jakarta: EGC; 2012. p. 263–5.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. In: Pseudomonas and Related Bacteria. 8th ed. Canada: Elsevier; 2016. p. 278–85.
3. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. In: Pseudomonas aeruginosa and Other Pseudomonas Species. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 2686–99.
4. Barer MR, Irving W, Swann A, Perera N. Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections. In: Pseudomonads and nonfermenters: Opportunist infection; cystic fibrosis; melioidosis. 19th ed. China; 2018. p. 230–7.
5. Champoux JJ, Drew WL, Neidhardt FC, Plorde JJ. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. In: Ryan KJ, Ray CG, editors. Pseudomonas and Other Opportunistic Gram-negative Bacilli. 6th ed. USA: McGraw Hill; 2014. p. 385–90.
6. Ilic D, Nikolic V, Nikolic L, Stankovic M, Stanojevic L, Cakic M. Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. Facta Univ - Ser Physics, Chem Technol. 2011;9(1):9–20.

Research Article

7. Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J phytomedicine* [Internet]. 2014;4(1):1–14.
8. Alli JA, Boboye BE, Okonko IO, Kolade AF, Nwanze JC. In-vitro assessments of the effects of garlic (*Allium sativum*) extract on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Pelagia Res Libr*. 2011;2(4):25–36.
9. Utami P, Mardiana L, PS TP. *Umbi Ajaib Tumpas Penyakit*. Jakarta: Penebar Swadaya; 2013.
10. Adhuri IK, Kristina TN, Antari AL. Perbedaan Potensi Antibakteri Bawang Putih Tunggal Dengan Bawang Putih Majemuk Terhadap Salmonella Typhi. *Diponegoro Med J (Jurnal Kedokt Diponegoro)*. 2018;7(2):415–23.
11. Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke MCH, Nwachukwu ID, Slusarenko AJ. Allicin: Chemistry and biological properties. *Molecules*. 2014;19(8):12591–618.
12. Meriga B, Mopuri R, MuraliKrishna T. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(5):391–5.
13. Bramanti I, Ngatijan, Purwono S. The acceleration of garlic (*Allium sativum* L) ethanolic extract on gingival wound healing process in Wistar rats. *J. Med. Sci*. 2013;45(2): 51-60
14. Hutomo S, Susilowati H, Agustina D, Asmara W. Analysis of Anti-S. Sanguinis IgY Ability to Inhibit Streptococcus sanguinis Adherence. *Dent J (Maj Ked Gi)*. 2018;51(1):33-6
15. Lihua L, Jianhui W, Jialin Y, Yayin L, Guanxin L. Effects of allicin on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors. *Polish J Microbiol*. 2013;62(3):243–51.
16. Wu X, Santos RR, Fink-Gremmels J. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: Model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of staphylococcus epidermidis. *Food Sci Nutr*. 2015;3(2):158–68.
17. Jakobsen TH, Van Gennip M, Phipps RK, Shanmugham MS, Christensen LD, Alhede M, et al. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2314–25.
18. Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules*. 2014;19(12):20034–53.
19. Benmeziane F, Djermoune-Arkoub L, Adamou Hassan K, Zeghad H. Evaluation of antibacterial activity of aqueous extract and essential oil from garlic against some pathogenic bacteria. *Int Food Res J*. 2018;25(2):561–4.
20. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Curr Med Chem*. 2014;22(1):132–49.
21. Manner S, Fallarero A. Screening of natural product derivatives identifies two structurally related flavonoids as potent quorum sensing inhibitors against gram-negative bacteria. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1346.