



Penurunan Viabilitas dan Ekspresi Gen Virulensi *Salmonella* Typhimurium Akibat Paparan Ekstrak Air Bawang Putih

[Reduction of Viability and Virulence Gene Expression of *Salmonella* Typhimurium by Aqueous Garlic Extract]

Andani Tiara¹⁾, Siti Nurjanah^{1,2)*}, dan Zakiah Wulandari³⁾

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ South-East Asia Food & Agricultural Science and Technology (SEAFAST) Center, IPB University, Bogor, Indonesia

³⁾ Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, IPB, Bogor, Indonesia

Received December 10th 2023 / Revised October 21st 2024 / Accepted December 9th 2024

ABSTRACT

Garlic contains antibacterial compounds that are heat-sensitive. The ultrasonic bath method can reduce extraction time and oxidative degradation during aqueous garlic extraction, enhancing its antibacterial properties. *Salmonella* Typhimurium, a common bacterial contaminant in chicken, can cause salmonellosis in humans by expressing specific virulence genes. This study examined the reduction in the expression of *S. Typhimurium* virulence genes (*stm*, *invA*, *stn*, and *pefA*) after exposure to aqueous garlic extract. Freeze-dried garlic was dissolved in several concentrations (5, 10, 20, 40, and 80 mg/mL distilled water) and sonicated using an ultrasonic bath for 5, 10, and 20 min. Total phenolic content of each extract was measured, and the minimum bactericidal, minimum inhibitory, and sub-inhibitory concentrations against *S. Typhimurium* were also determined. Virulence gene expression was measured by reverse transcription q-PCR. The extract prepared at 80 mg/mL for 20 min showed a higher phenolic content (366.57 mg GAE/100 g) and inhibition zone (19 mm). MBC, MIC, and SIC concentrations were 80, 40, and 20 mg/mL. *S. Typhimurium* exposed by MIC and SIC for 2 h reduced the number (1.39 and 1.22 log reduction CFU/mL) and down-regulated the expression genes (*stm*, *invA*, *stn*, and *pefA*). The higher reduction of expression genes was observed for *invA* (0.98 and 0.75 log reduction) relative to the 16s rRNA housekeeping gene. These results suggest that the aqueous garlic extracts reduce the bacterial count and the virulence of *S. Typhimurium*.

Keywords: antimicrobial, garlic, *S. Typhimurium*, ultrasonication, virulence gene

ABSTRAK

Bawang putih mengandung senyawa antibakteri yang sensitif terhadap panas. Metode ekstraksi *ultrasonic bath* dapat mengurangi waktu ekstraksi dan degradasi oksidatif selama ekstraksi bawang putih, sehingga meningkatkan sifat antibakterinya. *S. Typhimurium*, bakteri kontaminan pada ayam, dapat menyebabkan salmonellosis pada manusia karena keberadaan gen virulensi. Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis penurunan ekspresi gen virulensi (*stm*, *invA*, *stn*, dan *pefA*) pada *S. Typhimurium* setelah terpapar ekstrak air bawang putih. Bawang putih kering-beku dilarutkan (5, 10, 20, 40, dan 80 mg/mL air distilasi) dan disonikasi selama 5, 10, dan 20 menit. Kandungan total fenolik setiap ekstrak diukur dan konsentrasi minimum bakterisidal (MBC), penghambatan minimum (MIC), dan sub-penghambatan minimum (SIC) terhadap *S. Typhimurium* juga ditentukan. Ekspresi gen virulensi diukur dengan *reverse transcription* q-PCR. Ekstrak 80 mg/mL yang diultrasonikasi selama 20 menit menunjukkan kandungan fenolik yang lebih tinggi (366,57 mg GAE/100 g) dan zona inhibisi (19 mm). Konsentrasi MBC, MIC, dan SIC adalah sebesar 80, 40 dan 20 mg/mL. *S. Typhimurium* yang dipaparkan konsentrasi MIC dan SIC selama 2 jam menurunkan jumlah bakteri (1,39 dan 1,22 log CFU/mL dan ekspresi gen virulensi (*stm*, *invA*, *stn*, dan *pefA*). Penurunan tertinggi terjadi pada *invA* (0,98 dan 0,75 log) setelah dibandingkan dengan gen *housekeeping 16s rRNA*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak air bawang putih menurunkan jumlah bakteri dan virulensi *S. Typhimurium*.

Kata kunci: antibakteri, bawang putih, gen virulensi, *S. Typhimurium*, ultrasonikasi

*Penulis Korespondensi: E-mail: sity_nr@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Daging unggas, telur, *seafood*, sayur, dan buah merupakan bahan pangan yang paling sering menjadi perantara infeksi bakteri dan 3,5% ayam broiler segar terinfeksi *Salmonella* spp (Antunes *et al.*, 2016). Salmonellosis merupakan infeksi gastrointestinal pada manusia yang paling sering ditemukan dan bersumber dari hewan yang terinfeksi *Salmonella* spp. *Salmonella enterica* adalah salah satu spesies utama dari *Salmonella* spp. yang menjadi agen *food-borne illness* (Kureljušić *et al.*, 2021). *Serotype* dari *Salmonella enterica* yang mengakibatkan salmonellosis dan banyak ditemukan pada manusia adalah *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, selanjutnya disebut *S. Typhimurium*, dengan prevalensi penyebaran penyakit yang lebih luas dibanding jenis *Salmonella* lainnya seperti *S. Infantis*, *S. Stanley*, dan *S. Thompson* (Hugas dan Beloeil, 2014). Sifat patogenitas *Salmonella* telah dikaitkan dengan banyaknya gen virulensi pada kromosom *Salmonella* (SPI), yang bertanggung jawab untuk mengodekan berbagai gen virulensi, seperti *stm* (protein untuk fimbrial), *invA* (protein untuk invasi), *stn* (protein untuk produksi toksin), dan *pefA* (protein untuk adhesi) yang mengakibatkan salmonellosis (Thung *et al.*, 2018).

Penggunaan antibiotik dalam pengobatan infeksi bakteri patogen merupakan langkah awal yang efektif, namun meningkatkan risiko resistensi antibiotik. Hal ini menjadi salah satu alasan meningkatnya penggunaan herbal dan rempah-rempah sebagai bahan alami yang berisiko rendah terhadap resistensi (Muhammad *et al.*, 2020). Bawang putih (*A. sativum*) dikenal sebagai rempah/tanaman yang tinggi akan aktivitas antibakterinya, karena kandungan organosulfur (*allicin*, *ajoene*, dan organosulfur lain), *essential oil*, dan flavonoid yang mengganggu proses sintesis protein melalui reaksi pertukaran disulfida (Borlinghaus *et al.*, 2014). Namun, sebagian senyawa aktif dalam bawang putih bersifat volatil dan mudah terdegradasi (Tavares *et al.*, 2021).

Metode ekstraksi dengan *ultrasonic bath* tanpa pemanasan diketahui mampu mengekstraksi komponen bioaktif dengan efisien, dan mengurangi risiko oksidasi komponen bioaktif (Ismail *et al.*, 2014). Prinsip kerja metode ultrasonikasi didasarkan oleh efek kavitasi dari gelombang ultrasonik berfrekuensi 20–100 kHz, yang meningkatkan laju transfer dan *yield* ekstrak komponen bioaktif (Sanjaya *et al.*, 2022). Bawang putih yang diultrasonikasi selama 15 menit pada frekuensi 60 Hz meningkatkan kandungan fenolik 5,84 mg GAE/g dan *thiosulfates* 6,42 $\mu\text{mol/g}$ (Cavalcanti *et al.*, 2021). Metode ekstraksi ini menunjukkan potensi besar dalam meningkatkan kemampuan bawang putih sebagai agen antibakteri yang efektif. Bawang putih yang disonikasi selama 5

menit pada frekuensi 37 KHz dilaporkan memiliki kandungan fenolik sebesar 57,35 mg GAE/100 g yang menghambat pertumbuhan *E. coli* sebesar 10,67 mm (Liaqat *et al.*, 2019).

Penurunan jumlah bakteri saat dipaparkan bawang putih berkaitan dengan penurunan ekspresi gen. Penurunan laju pertumbuhan bakteri menandakan aktivitas metabolisme bakteri terhambat, dengan enzim RNA polimerase sebagai target dari antibakteri bawang putih untuk dihentikan (Rouf *et al.*, 2020). RNA polimerase merupakan enzim yang bertanggung jawab untuk mensintesis RNA dan digunakan untuk sintesis protein atau fungsi biologis sel bakteri. Jika laju pertumbuhan bakteri menurun, ekspresi gen yang mengatur fungsi sel secara keseluruhan pun menurun (Klumpp *et al.*, 2009), mengakibatkan sifat patogen dari bakteri menurun.

Oleh karena itu, hipotesis penelitian ini adalah terjadi penurunan jumlah bakteri dan ekspresi gen virulensi *S. Typhimurium* yang terpapar ekstrak bawang putih. Penurunan ekspresi gen mengacu pada metode *reverse transcription* qPCR. Metode ini mampu mendeteksi RNA, yang meskipun kurang stabil, tetap mewakili fungsi genetik bakteri. RNA kemudian ditranskripsi balik menjadi cDNA (DNA komplementer) oleh enzim *reverse transcriptase* dalam proses amplifikasi *real-time* PCR. cDNA lebih stabil dan tidak mudah terdegradasi, membuatnya ideal untuk analisis ekspresi gen (Đermić *et al.*, 2023). Hasil dari amplifikasi *real-time* PCR di ekspresikan dalam nilai siklus (C_t), yang mencerminkan jumlah RNA atau gen dalam sampel dan digunakan untuk mengukur ekspresi gen (Salimi *et al.*, 2023).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama penelitian adalah bawang putih yang diperoleh dari Kabupaten Temanggung, *S. Typhimurium* yang berasal dari karkas ayam broiler diperoleh dari Melati (2021). Terdapat bahan analisis yaitu akuades, asam galat, Na_2CO_3 , reagen *Folin-Ciocalteu*, media *brain heart infusion broth* (BHIB, Oxoid Ltd., Hampshier, Inggris), media *mueller hinton agar* (MHA, Oxoid Ltd., Inggris), media *trypticase soy broth* (TSB, Oxoid Ltd., Inggris), media *xylose lysine deoxycholate agar* (XLDA, Oxoid Ltd., Inggris), Presto™ Mini gDNA Bacteria kit (Geneaid, RRC), GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Amerika Serikat), *Nuclease Free Water* (NFW, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Amerika Serikat), Genezol™ TriRNA pure kit (Geneaid, RRC), SensiFast™ cDNA *synthesis kit* (Bioline, Inggris), Thunderbird® SYBR qPCR Mix (Toyobo, Co.Ltd., Jepang), etanol 96% pro analisis (Smart-lab, Indonesia), dan gel *red* (Bioline, Inggris).

Ekstraksi bawang putih

Bawang putih segar dibersihkan dan dimasukkan dalam freezer suhu -20°C selama 24 jam. Bawang putih beku diletakkan dalam mesin *freeze-dryer* (ALPHA 1-2 LDPlus, MARTIN CHRIST, Jerman) yang terkontrol dengan suhu -20°C , tekanan vakum 108 Pa, serta suhu kondensasi pada *chamber* diatur pada suhu -65°C . Bawang putih kering dihaluskan dengan grinder (FOMAC FGD-Z200, Indonesia) sampai menghasilkan bubuk bawang putih. Bubuk bawang putih kering beku dilarutkan dalam akuades (5, 10, 20, 40, dan 80 mg/mL) dan diletakkan pada bak ultrasonikasi (Branson Ultrasonic Cleaner model 8510E MTH, Amerika Serikat) pada suhu ruang yaitu 24°C selama 5, 10 dan 20 menit, frekuensi 37 kHz (Loghmanifar et al., 2022). Ekstrak air bawang putih disentrifugasi, supernatannya diambil, dan disimpan dalam freezer pada suhu -20°C .

Penentuan total fenolik

Sebanyak 500 μL ekstrak air bawang putih ditambahkan 2,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* 0,2 M dan 2 mL larutan Na_2CO_3 . Larutan didiamkan pada kondisi gelap selama 30 menit. Larutan diukur absorbansi pada panjang gelombang 760 nm menggunakan UV-1900 UV-Vis *spectrophotometer* (Shimadzu Corporation, Jepang). Konsentrasi senyawa fenolik dalam ekstrak dihitung dalam mg asam galat (GAE) per g ekstrak kering dengan menggunakan kurva standar asam galat (Nagella et al., 2014).

Aktivitas antibakteri, MBC, MIC, dan SIC

Kekeruhan *S. Typhimurium* dalam BHIB dibandingkan dengan kekeruhan standar 0,5 *McFarland*. Isolat bakteri *S. Typhimurium* diswab di atas seluruh permukaan MHA dengan *cotton swab* steril. *Cork-borer* berukuran 9 mm steril disiapkan untuk membuat lubang pada permukaan agar MHA. Sebanyak 2 mL ekstrak air bawang putih berbagai konsentrasi ditempatkan ke dalam sumur-sumur dan dibiarkan menyerap selama 1 jam pada suhu ruang 24°C . Cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Diameter zona hambat yang terbentuk di setiap sumur diamati (Gabriel et al., 2022).

Penentuan konsentrasi terkecil menghambat pertumbuhan bakteri (MIC) dari ekstrak air bawang putih merujuk pada metode makrodilusi. Serial tabung berisikan 5 mL TSB dan berbagai konsentrasi ekstrak air bawang putih (80, 40, 20, 10, dan 5 mg/mL) (Oktaviani, 2022) diinokulasi dengan 0,1 mL biakan 10^6 CFU/mL isolat *S. Typhimurium*. Serial tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Tabung pertama dari serial tabung yang tidak memperlihatkan kekeruhan, dianggap sebagai nilai MIC. Tabung yang tidak menunjukkan kekeruhan digoreskan pada media XLDA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Konsentrasi tertinggi yang tidak memperlihatkan pertumbuhan bakteri *S. Typhi-*

murium dianggap sebagai nilai MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) (Alirezaei et al., 2019). Penentuan konsentrasi SIC (*Sub-Inhibitory Concentration*) dilakukan dengan melihat nilai yang berada di bawah konsentrasi MIC (Narimisa et al., 2020).

S. Typhimurium dipaparkan dengan konsentrasi MIC dan SIC menggunakan metode *pour plate*. Sebanyak 0,1 mL kultur bakteri *S. Typhimurium* 10^6 CFU/mL (6,36 log CFU/mL) dimasukkan ke dalam 9 mL TSB berisikan konsentrasi MIC (40 mg/mL) dan SIC (20 mg/mL) ekstrak bawang putih. Tabung berisikan bakteri terpapar dilakukan inkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C (Yang et al., 2016). Sebanyak 1 mL suspensi bakteri dimasukkan dalam cawan petri dan dituang dengan media XLDA. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Perhitungan jumlah bakteri menggunakan ketentuan *Enterobacteriaceae* dalam ISO (2007) dengan jumlah bakteri 10–300 pada cawan petri. Penurunan jumlah bakteri dihitung dengan membandingkan jumlah bakteri awal dikurangi dengan jumlah bakteri terpapar konsentrasi MIC dan SIC ekstrak bawang putih.

Deteksi gen virulensi *stm*, *invA*, *stn*, dan *pefA*

Ekstraksi DNA *S. Typhimurium* dilakukan menggunakan kit DNA Presto™ Mini gDNA Bacteria kit (Geneaid, RRC). Prosedur ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan instruksi kerja yang tertera. Amplifikasi DNA dalam reaksi PCR dengan mencampurkan 1 μL (100 ng/ μL) template DNA, 1 μL (10 μM) masing-masing primer *forward* dan *reverse* yang tertera pada Tabel 1, 10 μL (2X) GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Amerika Serikat), dan *nuclease free water* (NFW, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Amerika Serikat) sampai volume akhir reaksi mencapai 20 μL . Kondisi amplifikasi pada mesin PCR tertera pada Tabel 2.

Pengamatan produk PCR dilakukan dengan elektroforesis, 4 μL DNA dan 3 μL *ladder* dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 2% yang direndam dalam larutan buffer TAE 1X. Gel agarose dielektroforesis pada voltase 85 V selama 45 menit. Hasil gel agarose yang dielektroforesis, direndam dalam larutan buffer TAE 1X dan gel red selama 30 menit. Pita hasil produk PCR divisualisasikan menggunakan Geldoc (Bio-Rad).

Pengukuran ekspresi gen virulensi

Isolat bakteri *S. Typhimurium* 10^6 CFU/mL diinokulasikan sebanyak 1 mL ke dalam media TSB berisikan ekstrak air bawang putih pada konsentrasi SIC dan MIC, diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam dan diekstraksi RNA. Ekstraksi RNA menggunakan Genezol™ TriRNA Pure Kit (Geneaid, RRC) dengan mengikuti instruksi produsen dan kemurnian diukur menggunakan spektrofotometer Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Amerika Serikat).

Tabel 1. Primer dan urutan primer yang digunakan dalam penelitian

Table 1. Primers and primer sequences used in the research

Gen Target (Target Gene)	Sekuens Primer (Primer Sequences)	Ukuran (bp) (Size) (bp))	Referensi (Reference)
16s rRNA	F: CAGAAGAAGCACCGGCTAAC R: GACTCAAGCCTGCCAGTTTC	403	(Yosua, 2018)
stm311	F: AACAAACGGCTCCGGTAATGAGATTG R: ATGACAAACTCTTGATTCTGAAGATCG	311	(Yosua, 2018)
invA	F: TATCGCCACGTTCCGGCAA R: TCGCACCGTCAAAGGAACC	275	(Thung et al., 2018)
stn	F: CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG R: TGCCCAAAGCAGAGAGATTC	260	(Yulian et al., 2020)
pefA	F: GCGCCGCTCAGCCGAACCAG R: GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG	157	(Skyberg et al., 2006)

Tabel 2. Kondisi amplifikasi gen virulensi S. Typhimurium

Table 2. Amplification condition of virulence gene S. Typhimurium

Gen Target (Target Gene)	Tahapan Amplifikasi (Amplification Stages)	Suhu (°C) (Temperature (°C))	Waktu (Time)	Referensi (Reference)
16s rRNA dan stm311 (16s rRNA and stm311)	Pra-denaturasi (Pre-denaturation)	95	3 menit (min)	(Yosua, 2018)
	Denaturasi (Denaturation)	95	30 detik (sec)	
	Annealing	57	30 detik (sec)	
	Ekstensi awal (Initial extention)	72	45 detik (sec)	
	Ekstensi akhir (Final extention)	72	5 menit (min)	
invA dan stn (invA and stn)	Pra-denaturasi (Pre-denaturation)	94	2 menit (min)	(Thung et al., 2018) (Yulian et al., 2020)
	Denaturasi (Denaturation)	94	30 detik (sec)	
	Annealing	53.8	1 menit (min)	
	Ekstensi awal (Initial extention)	72	1 menit (min)	
	Ekstensi akhir (Final extention)	72	7 menit (min)	
pefA	Pra-denaturasi (Pre-denaturation)	95	5 menit (min)	(Skyberg et al., 2006)
	Denaturasi (Denaturation)	94	30 detik (sec)	
	Annealing	60	30 detik (sec)	
	Ekstensi awal (Initial extention)	72	2 menit (min)	
	Ekstensi akhir (Final extention)	72	10 menit (min)	

Hasil ekstraksi RNA ditranskripsi menjadi cDNA menggunakan SensiFast™ cDNA synthesis kit (Bio-line), berdasarkan instruksi produsen. Campuran reaksi diinkubasi dalam PCR Thermal Cyclor 2720 dengan kondisi 25 °C selama 10 menit (primer *annealing*), 42 °C selama 15 menit (*reverse transcription*), 85 °C selama 5 menit (*RT inactivation*). cDNA diukur konsentrasi dan kemurnian dengan menggunakan nanodrop ($\lambda = 260/280$).

cDNA dalam reaksi *real-time* PCR diamplifikasi dengan mencampurkan 1 μ L template cDNA, 10 μ L Thunderbird® SYBR qPCR Mix, 1 μ L masing-masing primer (konsentrasi akhir 10 μ M) dan 7 μ L *nuclease free water* (NFW, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Amerika Serikat) sampai volume akhir mencapai 20 μ L. Kondisi *real-time* PCR yang digunakan sesuai dengan hasil dari optimasi *running* PCR. Ekspresi gen relatif dihitung menggunakan nilai siklus (C_t) yang terdeteksi dengan rumus perhitungan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen dan Livak 2008).

Analisis data

Data hasil pengujian dianalisis dengan ANOVA dan uji lanjut DMRT pada taraf signifikan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total fenolik

Senyawa bioaktif seperti fenolik dan organo-sulfur telah terbukti efektif dalam menghambat bakteri penyebab *foodborne diseases* dan *spoilage*. Senyawa-senyawa ini membentuk ikatan hidrogen dengan situs aktif enzim pada bakteri, yang mengakibatkan ketidakstabilan pada membran sitoplasma (Takó et al., 2020). Konsentrasi dan waktu ultrasonikasi ekstrak air bawang putih secara signifikan memengaruhi total fenolik ($p < 0,05$) (Tabel 3). Semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama waktu ekstraksi, semakin banyak total fenolik yang ter-ekstrak. Konsentrasi 80 mg/mL ekstrak air bawang putih yang diultrasonikasi selama 20 menit menghasilkan total fenolik sebesar 366,57 mg GAE/100 g bubuk bawang putih. Sebaliknya, konsentrasi 5 mg/mL menghasilkan total fenolik sebesar 4,26 sampai 5,77 mg GAE/100 g. Total fenolik meningkat seiring dengan waktu ultrasonikasi yang lebih lama hingga 20 menit.

Tabel 3. Total fenolik konsentrasi ekstrak air bawang putih pada waktu ultrasonikasi yang berbeda
 Table 3. Total phenolic concentrations of aqueous garlic extract at different ultrasonication time

Konsentrasi Ekstrak Air Bawang Putih (mg bubuk/mL akuades) (Concentrations of Aqueous Garlic Extract (mg powder/mL aquadest))	Total Fenolik (mg GAE/100 g bubuk bawang putih) (Total Phenolic (mg GAE/100 g garlic powder))		
	Waktu Ekstraksi (menit) (Extraction Time (min))		
	5	10	20
5	4.26±0.13 ^{Aa}	4.87±0.16 ^{Aa}	5.77±0.35 ^{Aa}
10	11.43±0.23 ^{Ab}	21.24±0.29 ^{Bb}	21.92±0.34 ^{Bb}
20	59.42±0.32 ^{Ac}	69.47±0.56 ^{Bc}	79.94±0.42 ^{Cc}
40	142.33±0.89 ^{Ad}	165.69±1.60 ^{Bd}	175.33±0.98 ^{Cd}
80	349.58±1.69 ^{Ae}	352.09±2.31 ^{Be}	366.57±0.70 ^{Ce}

Keterangan: Per 100 g bubuk bawang putih dalam basis basah. Data disajikan sebagai rerata dari tiga kali pengulangan ±standar deviasi. Perbedaan huruf besar di baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Perbedaan huruf kecil di kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$)

Note: 100 g garlic powder in wet basis. Data are presented as the mean of three repetitions ±standard deviation. Superscript differences in capital letters within the same row indicate significantly different values ($p<0.05$). Superscript differences in lowercase letters within the same column indicate significantly different values ($p<0.05$)

Waktu ultrasonikasi selama 10 sampai 20 menit merupakan waktu optimal untuk ekstraksi senyawa fenolik (Dranca dan Oroian, 2016). Namun, paparan ultrasonikasi yang terlalu lama juga mengakibatkan kerusakan pada struktur komponen aktif dan berpotensi menurunkan hasil ekstraksi (Mehta *et al.*, 2022).

Hasil penelitian sejalan dengan studi yang melaporkan kandungan fenolik ekstrak air bawang putih meningkat dengan metode ultrasonikasi sampai 209,70 mg GAE/g, dibandingkan dengan metode maserasi (85,23 mg GAE/g) dan Soxhlet (102,13 mg GAE/g) (Romes *et al.*, 2019). Ekstraksi dengan ultrasonikasi memberikan fenomena kavitasi dan efek mekanis. Ultrasonik memberikan efek mekanis yang menciptakan kerusakan pada dinding sel ketika gelembung kavitasi pecah dan menyebabkan peningkatan difusi pelarut pada matriks dan pelepasan senyawa intraseluler ke media (Dranca dan Oroian 2016). Selain itu, pelarut air memfasilitasi difusi senyawa fenolik ke media yang lebih polar dibandingkan pelarut organik, sehingga meningkatkan hasil ekstraksi berupa senyawa polifenolik dan flavonoid (Yeop *et al.*, 2017).

Aktivitas antibakteri MBC, MIC, dan SIC

Aktivitas antibakteri dari bawang putih telah banyak dipublikasikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi minimum 6,25% (375 mg/mL) ekstrak air bawang putih menghambat *S. aureus* dan *E. coli* dengan zona hambat sebesar 34 dan 26 mm (Magryś *et al.*, 2021). Penelitian ini juga membuktikan bahwa ekstrak air bawang putih yang di ultrasonikasi menghambat pertumbuhan *S. Typhimurium* (Tabel 4). Konsentrasi dan waktu ultrasonikasi ekstrak air bawang putih memengaruhi zona hambat pada *S. Typhimurium*, dengan interaksi signifikan antara keduanya ($p<0,05$). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak air bawang putih dan semakin lama waktu ekstraksi, semakin besar aktivitas anti-

bakterinya, yang ditunjukkan oleh zona hambat yang terbentuk. Konsentrasi 80 mg/mL ekstrak air bawang putih yang diultrasonikasi selama 5, 10, dan 20 menit menghambat *S. Typhimurium* lebih besar yaitu 15; 17,3; dan 19 mm dibanding konsentrasi lain. Konsentrasi tersebut termasuk dalam kategori kuat sebagai antibakteri karena memiliki zona hambat lebih dari 10–20 mm (Davis dan Stout, 1971). Komponen organosulfur seperti *allicin*, *diallyl sulfide*, *ajoene* dan *alliin* dalam bawang putih berperan penting dalam penetrasi ke dalam sel bakteri, menyebabkan kerusakan dan kebocoran pada sitoplasma bakteri (Shang *et al.*, 2019).

Konsentrasi 5 mg/mL pada setiap waktu ultrasonikasi tidak menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk, karena konsentrasi tersebut belum mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Tabel 4). Konsentrasi terkecil ekstrak air bawang putih yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif adalah 7,81 sampai 62,5 mg/mL (Lee dan Musa, 2008). Sejalan dengan hasil penelitian bahwa konsentrasi 40 mg/mL ekstrak air bawang putih merupakan konsentrasi minimum yang menghambat pertumbuhan *S. Typhimurium* (MIC). Setelah 24 jam pemaparan, konsentrasi minimum yang menghentikan pertumbuhan bakteri (MBC) adalah 80 mg/mL. Namun, konsentrasi 10 dan 20 mg/mL di setiap waktu ekstraksi masih memperlihatkan keberadaan *S. Typhimurium* (Tabel 4). Ketika konsentrasi tersebut diukur zona hambatnya, konsentrasi 20 mg/mL memiliki aktivitas hambatan yang lebih besar yaitu 7,0–8,3 mm dibanding 10 mg/mL. Oleh karenanya, konsentrasi 20 mg/mL ditetapkan sebagai konsentrasi *sub-inhibitory concentrations* (SIC). Konsentrasi SIC telah terbukti memengaruhi bakteri dengan berbagai cara seperti menginduksi perubahan morfologi, mengubah struktur permukaan sel, menghambat produksi enzim dan toksin serta menekan adhesi bakteri ke sel inang (Kwon dan Lee 2020).

Tabel 4. Nilai MIC dan zona hambatan *S. Typhimurium* yang dipaparkan berbagai konsentrasi ekstrak air bawang putih pada waktu ultrasonikasi yang berbedaTable 4. MIC value and inhibition zones of *S. Typhimurium* exposed to various concentrations of aqueous garlic extract at different ultrasonication time

Konsentrasi Ekstrak Air Bawang Putih (mg bubuk/mL akuades) (Concentrations of Aqueous Garlic Extract (mg powder/mL aquadest))	Pertumbuhan Bakteri (Bacterial Growth)			Zona Hambat (mm) (Inhibition Zone (mm))		
	Waktu Ekstraksi (menit) (Extraction Time (minutes))					
	5	10	20	5	10	20
5	+	+	+	0.0±0.00 ^{Aa}	0.0±0.00 ^{Aa}	0.0±0.00 ^{Aa}
10	+	+	+	5.0±1.00 ^{Ab}	5.7±1.00 ^{ABbc}	6.0±0.58 ^{ABbc}
20	+	+	+	7.0±0.82 ^{ABc}	7.0±1.00 ^{ABc}	8.3±1.00 ^{Bc}
40	-	-	-	10.3±0.94 ^{Ad}	11.3±0.58 ^{ABd}	12.3±1.00 ^{Bd}
80	-	-	-	15.0±0.82 ^{Ae}	17.3±0.58 ^{Be}	19.0±0.58 ^{Ce}

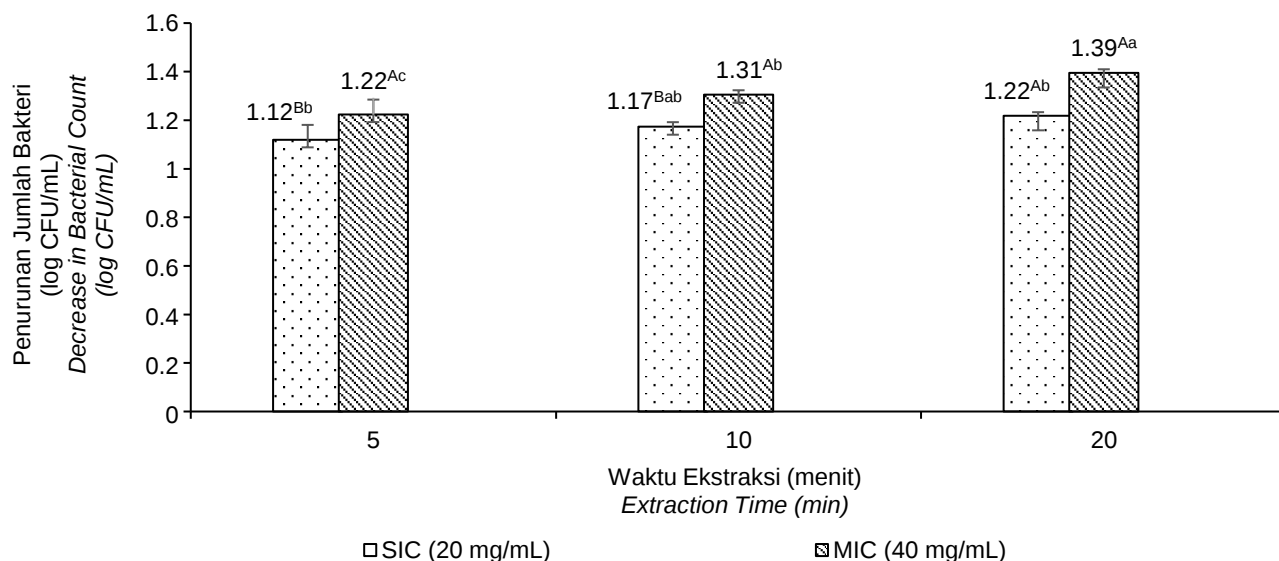
Keterangan: Tanda positif (+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Data disajikan sebagai rata-rata dari tiga kali ulangan (pengulangan) ±standar deviasi. Perbedaan huruf besar di baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Perbedaan huruf kecil di kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). MIC= minimum inhibitory concentration

Note: The positive sign (+) indicates bacterial growth. Data are presented as the mean of three repetitions ±standard deviation. Superscript differences in capital letters within the same row indicate significantly different values ($p<0.05$). Superscript differences in lowercase letters within the same column indicate significantly different values ($p<0.05$). MIC= minimum inhibitory concentration

Konsentrasi MIC dan SIC diultrasonikasi selama 5, 10, dan 20 menit dan dipaparkan pada *S. Typhimurium* selama 2 jam menurunkan jumlah bakteri berturut-turut 1,22; 1,31; dan 1,39 log CFU/mL (dari jumlah awal bakteri 6,36 log CFU/mL) (Gambar 1). Sementara itu, penurunan jumlah bakteri pada konsentrasi SIC adalah 1,12; 1,17; dan 1,22 log CFU/mL. Konsentrasi SIC tidak efektif dalam menghentikan pertumbuhan bakteri, sehingga sel bakteri terus tumbuh meskipun dengan laju yang lebih rendah (Serwecińska, 2020). Penurunan jumlah *S. Typhimurium* pada konsentrasi MIC dan SIC hanya mencapai 1 siklus log, akibat waktu paparan antibakteri selama 2 jam. Waktu paparan pada kedua konsentrasi ini dibatasi untuk mendapatkan sel bakteri yang masih bertahan sehingga dapat diukur gen virulensinya. Semakin lama paparan antibakteri, semakin besar peluang untuk mengurangi jumlah dan aktivitas bakteri yang bertahan. Konsentrasi 80 mg/mL ekstrak air bawang putih yang diultrasonikasi selama 5, 10, dan 20 menit tidak menunjukkan adanya pertumbuhan pada *S. Typhimurium* setelah pemaparan 24 jam. Konsentrasi 100 mg/mL ekstrak air bawang putih yang dipaparkan selama 4 jam menurunkan viabilitas *S. Typhimurium* sebesar 2,82 log CFU/mL (Oktaviani, 2022). Pemaparan ekstrak air bawang putih selama 3 jam mengubah morfologi sel *B. anthracis* dan menurunkan viabilitas bakteri sampai 6 siklus log jika paparan dilanjutkan selama 6 sampai 12 jam (Kaur *et al.*, 2021). Ekstrak bawang putih merusak membran sitoplasma bakteri melalui interaksi dengan enzim yang mengandung tiol termasuk cysteine protease dan alcohol dehydrogenase

yang penting untuk metabolisme bakteri (Kshirsagar *et al.*, 2018).

Semakin lama ekstrak air bawang putih diultrasonikasi, semakin besar penurunan jumlah *S. Typhimurium* ($p<0,05$). Konsentrasi MIC dan SIC yang diultrasonikasi selama 20 menit menekan jumlah *S. Typhimurium* lebih efektif dibanding 10 dan 5 menit (Gambar 1). Proses ekstraksi dengan ultrasonikasi yang lebih lama meningkatkan hasil ekstraksi berupa komponen bioaktif yang lebih tinggi. Selama ekstraksi, gelombang ultrasonik membentuk fenomena kavitasi sehingga sel tumbuhan mengalami pembengkakan, hidrasi dan pembentukan pori (Sanjaya *et al.*, 2022). Gelombang ultrasonik merambat melalui medium cairan (pelarut) berisi partikel sel tumbuhan, menciptakan siklus kompresi dan dekompresi yang menghasilkan gelembung mikroskopis, atau disebut fenomena kavitasi. Saat gelembung tersebut pecah, terjadi semburan (mikrojet) dengan kecepatan 200–700 m/s yang merusak dinding sel tumbuhan. Akibatnya, pelarut masuk ke dalam sel lebih cepat dan efisien, mempercepat transfer massa dan pelepasan isi sel ke dalam pelarut, sehingga meningkatkan hasil ekstraksi komponen bioaktif (Shen *et al.*, 2023). Dalam penelitian ini, komponen bioaktif yang terekstrak lebih banyak berupa gugus organosulfur bawang putih. Gugus tiol dalam bawang putih mengandung senyawa sulfur seperti *allicin*, yang memiliki sifat antibakteri. *Allicin* menurunkan kadar *glutathione* dan memodifikasi protein *S-allyl-mercapto* pada bakteri, sehingga mengakibatkan penurunan total kadar sulfhidril secara keseluruhan dan memicu respons terhadap stres oksidatif (Müller *et al.*, 2016).



Keterangan: SIC= sub-inhibitory concentrations, MIC= minimum inhibitory concentration

Note: SIC= sub-inhibitory concentrations, MIC= minimum inhibitory concentration

Gambar 1. Penurunan jumlah *S. Typhimurium* dipaparkan konsentrasi MIC dan SIC ekstrak air bawang putih selama 2 jam. Error bars menunjukkan standar deviasi dari tiga ulangan. Perbedaan huruf besar menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap konsentrasi ekstrak bawang putih. Perbedaan huruf kecil menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap waktu ekstraksi.

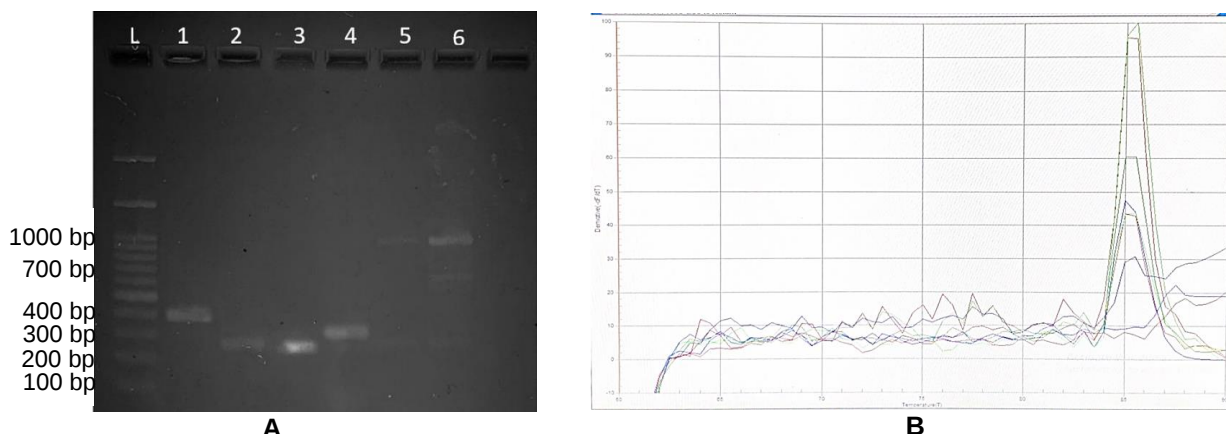
Figure 1. Reduction of the number of *S. Typhimurium* exposed by MIC and SIC of aqueous garlic extract for 2 h. Error bars represent standard deviations from three repetitions. Superscript differences in capital letters indicate significantly different values ($p < 0.05$) to concentrations of garlic's extract. Superscript differences in lowercase letters indicate significantly different values ($p < 0.05$) to extraction time.

Profil gen virulensi *stm*, *invA*, *stn*, dan *pefA*

Deteksi gen virulensi dilakukan untuk memastikan kehadiran gen-gen virulensi dalam *S. Typhimurium*. Konfirmasi gen virulensi pada isolat *S. Typhimurium* menggunakan primer *16s rRNA* (gen *housekeeping*), *stm311*, *invA*, *stn*, dan *pefA*. Hasil PCR dianalisis dengan gel agarose dan dielektroforesis untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukurannya (Wittmeier dan Hummel, 2022). Deteksi tersebut ditandai dengan munculnya pita atau band tebal yang sesuai dengan ukuran amplikonnya. Primer *16s rRNA* ditemukan pada pita amplikon berukuran 403 bp, sesuai dengan referensi (Gambar 2). Primer *stm311*, *invA*, dan *stn* juga ditemukan pada pita amplikon berukuran yang sesuai dengan referensi, yaitu 311, 275, dan 260 bp. Sementara, primer *pefA* yang dioptimasi pada suhu *annealing* 52 dan 60 °C membentuk beberapa pita amplikon berukuran 1000, 700, dan 300 bp (Gambar 2.A). Beberapa hasil studi menunjukkan bahwa gen *pefA* dipastikan terdapat pada isolat *S. Typhimurium* di berbagai ukuran yaitu 700 dan 300 bp sesuai dengan kondisi optimumnya (Namimatsu *et al.*, 2006; Gharieb *et al.*, 2015).

Gen *pefA* terletak pada plasmid *S. Typhimurium* yang berukuran 90 kb. Ketika besaran virulensi ter-

sebut dipecah menjadi segmen sebesar 13,9 kb, gen *pefA* ditemukan pada wilayah berukuran 2 kb (Friedrich *et al.*, 1993). Plasmid yang berukuran >50 kb diprediksi mengandung urutan/sekuens DNA yang berulang (Arredondo-Alonso *et al.*, 2017). Oleh karenanya, tidak menutup kemungkinan terjadi pengulangan urutan DNA yang menyebabkan terdeteksinya gen *pefA* di beberapa pita ampikon. Primer gen target digunakan kembali untuk mengukur ekspresi gen *S. Typhimurium*. Saat cDNA *S. Typhimurium* beserta gen target yang dianalisis dengan *real time* PCR, reagen pewarna dari SYBR green membutuhkan satu proses tahapan penting yaitu *melting*. Tahapan *melting* digunakan untuk memverifikasi spesifitas uji dari qPCR (*real-time* PCR) dan mengidentifikasi adanya amplifikasi tidak spesifik dari DNA (Paula dan Andow, 2021). Ketika suhu meningkat DNA untai ganda mulai mengalami denaturasi yang menyebabkan penurunan intensitas fluoresensi. Suhu *melting* dikenal dengan suhu yang 50% DNA terdenaturasi. Pada penelitian ini suhu *melting* yang digunakan ialah 60–90 °C/0,5 detik. Gen *pefA* menunjukkan suhu *melting* sebesar 85,5 °C (Gambar 2.B). Terbentuknya kurva leleh pada penelitian ini membuktikan bahwa gen *pefA* yang digunakan merupakan gen spesifik dari *S. Typhimurium*.



Keterangan: (L) Marker 100 bp plus DNA ladder, (1) gen 16s *rRNA*, (2) gen *invA*, (3) gen *stn*, (4) gen *stm311*, (5) gen *pefA* dengan suhu *annealing* 52 °C dan 25 siklus, (6) gen *pefA* dengan suhu *annealing* 60 °C dengan 30 siklus

Notes: (L) Marker 100 bp plus DNA ladder, (1) 16s *rRNA* gene, (2) *invA* gene, (3) *stn* gene, (4) *stm311* gene, (5) *pefA* gene with *annealing* temperature 52 °C and 25 cycles, (6) *pefA* gene with *annealing* temperature 60 °C and 30 cycles

Gambar 2. Visualisasi gen virulensi *S. Typhimurium* pada gel agarose 2% (A), kurva *melting* gen *pefA* pada suhu *annealing* 60 °C dengan 30 siklus (B)

Figure 2. Visualization of virulence genes of *S. Typhimurium* on a 2% agarose gel (A), melting curve of *pefA* gene in *annealing* temperature 60 °C with 30 cycles (B)

Penurunan ekspresi gen virulensi

Nilai *cycle threshold* (C_t) merupakan hasil dari serangkaian proses dengan *real time* PCR. Nilai C_t gen virulensi pada kontrol lebih rendah dibandingkan konsentrasi MIC dan SIC (Tabel 5). Ketika bakteri *S. Typhimurium* dipaparkan dengan konsentrasi MIC dan SIC ekstrak bawang putih, nilai C_t gen virulensi meningkat dari 23,68 sampai 26,75. Nilai C_t menunjukkan jumlah siklus yang diperlukan PCR untuk mendeteksi bakteri target dan nilainya berbanding terbalik dengan jumlah RNA target dalam sampel. Jumlah RNA yang tinggi ditunjukkan dengan nilai C_t yang rendah, dan sebaliknya (Amory *et al.*, 2023). Kuantifikasi nilai C_t setiap gen virulensi menggunakan rumus $2^{-\Delta\Delta C_t}$ untuk mengukur perubahan ekspresi gen virulensi *S. Typhimurium*. Kuantifikasi ini didasarkan pada normalisasi ekspresi gen target terhadap ekspresi gen *housekeeping* yang berfungsi sebagai standar internal dan tidak terpengaruh oleh berbagai perlakuan eksperimental (Adeola, 2018). Gen *housekeeping*, seperti 16s *rRNA*, diekspresikan secara konsisten diseluruh jaringan dan spesies. Gen 16s *rRNA* umum digunakan sebagai standar internal dalam kuantifikasi ekspresi gen pada bakteri. Gen 16s *rRNA* dibandingkan dengan RNA atau cDNA *S. Typhimurium* untuk melihat kestabilan perubahan nilai ekspresi gen saat sebelum dan sesudah pemaparan ekstrak bawang putih. Nilai C_t yang diukur dan dibandingkan dengan nilai gen *housekeeping* menunjukkan penurunan ekspresi gen virulensi (Gambar 3). Semua gen virulensi mengalami penurunan ekspresi gen, baik ketika dipaparkan konsentrasi MIC maupun SIC (setelah dibandingkan dengan gen *housekeeping*) (Gambar 3). Perbedaan

penurunan ekspresi gen virulensi yang signifikan teramati saat dipaparkan konsentrasi MIC dan SIC dibandingkan dengan kontrol. Setiap gen virulensi (*stm311*, *invA*, *stn*, dan *pefA*) pada kontrol tidak terjadi penurunan ekspresi gen. Penurunan ekspresi gen virulensi paling rendah pada gen *pefA* yang dipaparkan konsentrasi MIC dan SIC sebesar 0,56 dan 0,15 log. Dengan kondisi yang sama, penurunan ekspresi gen virulensi paling tinggi terjadi pada gen *invA* sebesar 0,98 dan 0,75 log. Bakteri menunjukkan pertahanan yang kuat saat dipaparkan dengan konsentrasi di bawah nilai MIC (Khan *et al.*, 2017).

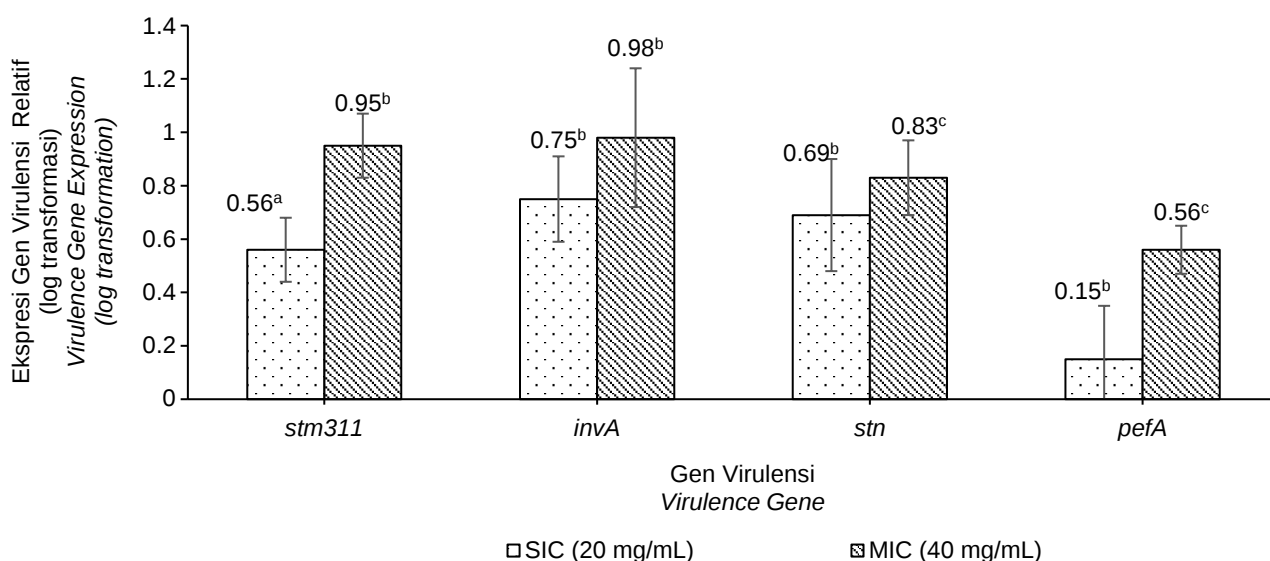
Pemaparan konsentrasi MIC dan SIC ekstrak air bawang putih memiliki dampak signifikan terhadap ekspresi gen yang menginvasi sel inang, seperti *invA*, dengan penurunan sebesar 0,98 dan 0,75 log. *Allicin*, senyawa aktif utama yang dilepaskan oleh bawang putih, mampu menembus membran fosfolipid bakteri dengan mudah (Zadeh *et al.*, 2020). Akibatnya, terjadi kerusakan pada membran bakteri yang menghentikan proses invasi sel inang. Dengan kondisi yang sama, ekspresi gen *stn*, yang memproduksi toksin penyebab infeksi gastroenteritis akut pada penelitian ini mengalami penurunan sebesar 0,83 dan 0,69 log. *Allicin* juga memicu pelepasan sinyal molekul seperti H_2S atau *gasotransmitter* yang memiliki efek fisiologis yang bervariasi, termasuk menghentikan aktivitas bakteri yang memengaruhi mikrobiota usus (Savairam *et al.*, 2023). Hasil penelitian ini sejalan dengan temuan bahwa gen *stn* diturunkan sebanyak 0,045 sampai 0,143 log akibat paparan CNS-ZnO. Akibatnya, *Salmonella* lebih mudah bermigrasi dari daerah apikal ke basolateral dan mengakhiri virulennya (Dawwam *et al.*, 2022).

Tabel 5. Nilai C_t gen virulensi *S. Typhimurium* yang dipaparkan konsentrasi MIC dan SIC ekstrak air bawang putih selama 2 jamTable 5. The C_t values of the virulence gene of *S. Typhimurium* exposed to MIC and SIC concentrations of aqueous garlic extract for 2 h

Konsentrasi Ekstrak Air Bawang Putih (mg bubuk/mL akuades) (Concentrations of Aqueous Garlic Extract (mg powder/mL aquadest))	C_t gen 16s rRNA	C_t gen <i>stm311</i>	C_t gen <i>invA</i>	C_t gen <i>stn</i>	C_t gen <i>pefA</i>
0	13.22±0.20 ^a	18.85±0.13 ^a	19.18±0.81 ^a	18.94±0.33 ^a	20.93±0.69 ^a
20	16.34±0.38 ^b	23.68±0.63 ^b	24.78±0.43 ^b	24.35±0.20 ^b	24.55±0.28 ^b
40	17.19±0.07 ^c	25.99±0.68 ^c	26.40±0.18 ^c	25.69±0.62 ^c	26.75±1.05 ^c

Keterangan: Data disajikan sebagai rerata dari tiga kali pengulangan ±standar deviasi. Perbedaan superskrip pada kolom yang sama menunjukkan nilai berbeda nyata ($p<0,05$) secara signifikan

Note: Data are presented as the mean of three repetitions ±standard deviation. Superscript differences within the same column indicate significantly different values ($p<0.05$)



Keterangan: SIC= sub-inhibitory concentrations, MIC= minimum inhibitory concentration

Note: SIC= sub-inhibitory concentrations, MIC= minimum inhibitory concentration

Gambar 3. Penurunan ekspresi gen virulensi *S. Typhimurium* yang dipaparkan konsentrasi MIC dan SIC ekstrak air bawang putih selama 2 jam. Error bars menunjukkan standar deviasi dari tiga ulanganFigure 3. Reduction of virulence gene expression *S. Typhimurium* exposed by MIC and SIC concentrations of aqueous garlic extract for 2 h. Error bars represent standard deviations from three repetitions

Gen *stm* dan *pefA* yang mengodekan protein *fimbriae* untuk melakukan adhesi atau penempelan pada sel inang (Nurjanah *et al.*, 2019; Rowlands *et al.*, 2014), juga mengalami penurunan ekspresi akibat konsentrasi MIC dan SIC sebesar 0,95 dan 0,51 log (*stm*) serta 0,56 dan 0,15 log (*pefA*). Penurunan *pefA* lebih rendah dibanding gen virulensi lainnya. Letak gen *pefA* pada plasmid menguntungkan bakteri untuk lebih resisten terhadap antibakteri (Robertson *et al.*, 2023), sehingga aktivitas virulensi *pefA* masih dapat berlanjut. Hasil studi lain melaporkan bahwa pemaparan 50 μ L *allicin* menurunkan gen adhesi *fimH* UPEC CFT073 dan J96 sebanyak 64 dan 77%, sehingga kemampuan untuk mengkolonisasi sel

epitel dan aktivitas adhesi berkurang (Yang *et al.*, 2016). Keberadaan *allicin* mencegah bakteri untuk melekat dan membentuk suatu biofilm baru.

Penurunan ekspresi gen virulensi menunjukkan bahwa konsentrasi MIC dan SIC ekstrak air bawang putih berpotensi untuk mengurangi aktivitas virulensi bakteri. *Allicin*, sebagai komponen organosulfur utama dalam bawang putih, mengganggu bioavailabilitas bakteri melalui pembentukan asetil CoA (Zadeh *et al.* 2020). Selain *allicin*, turunan senyawa organosulfur seperti *diallyl disulfide*, *diallyl trisulfide*, *ajoene*, *vinyl dithiin*, dan *methyl allyl disulfide* juga memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme serupa. Senyawa-senyawa ini bereaksi dengan sis-

tein dan grup sulfhidril bakteri, menyebabkan kerusakan pada membran dan dinding sel, menurunkan metabolisme dan menyebabkan stres oksidatif pada bakteri (Bhatwalkar *et al.*, 2021). Keterlibatan fenolik dalam bawang putih juga dapat merusak dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang mengurangi fungsi permeabilitas, transportasi aktif dan kemampuan untuk mengontrol protein dalam bakteri (Barbosa *et al.*, 2021).

KESIMPULAN

Konsentrasi 80 mg/mL ekstrak air bawang putih yang diultrasonikasi selama 20 menit memiliki total fenolik tertinggi yaitu 366,57 mg GAE/100 g dan menghambat bakteri *S. Typhimurium* sebesar 19 mm. Nilai MBC, MIC, dan SIC ekstrak air bawang putih adalah 80, 40, dan 20 mg/mL. Ekstrak air bawang putih yang diultrasonikasi menurunkan jumlah bakteri dan kemampuan virulensi gen *S. Typhimurium*. Paparan ekstrak air bawang putih pada konsentrasi MIC dan SIC selama 2 jam mampu menurunkan jumlah *S. Typhimurium* 1,39 dan 1,22 log CFU/mL serta menurunkan ekspresi gen virulensi *stm*, *invA*, *stn*, dan *pefA*. Penurunan ekspresi gen virulensi terbesar terjadi pada *invA* sebesar 0,98 dan 0,75 log serta penurunan terendah pada *pefA* sebesar 0,56 dan 0,15 log.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan dana melalui program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) No. 5879/IT3.D10/PT.01.02/P/T/2023. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Hanifah Nuryani Lioe, Dosen Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, yang telah memberikan bimbingan mengenai metode ekstraksi bawang putih dengan ultrasonikasi dan analisis total fenol serta membantu penyempurnaan naskah.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeola, F. (2018). Normalization of gene expression by quantitative RT-PCR in human cell line: Comparison of 12 endogenous reference genes. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 28(6), 741–748. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i6.9>
- Alirezadei, S., Godarzi, H., Moezi Ghadim, N., & Maheri, A. (2019). Antimicrobial activity of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) against *Porphyromonas gingivalis*: An in-vitro study. *Journal of Research in Dental and Maxillofacial Sciences*, 4(4), 17–22. <https://doi.org/10.29252/jrdms.4.4.17>
- Amory, H., Cesarini, C., De Maré, L., Loublier, C., Moula, N., Detilleux, J., Saulmont, M., Garigliany, M. M., Lecoq, L. (2023). Relationship between the cycle threshold value (Ct) of a *Salmonella* spp. qPCR performed on feces and clinical signs and outcome in horses. *Microorganisms*, 11(8), 1950. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081950>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J., van Schaik, W., & Schürch, A. C. (2017). On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial Genomics*, 3(10), 1–8. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000128>
- Barbosa, P. de P. M., Ruviaro, A. R., Martins, I. M., Macedo, J. A., LaPointe, G., & Macedo, G. A. (2021). Enzyme-assisted extraction of flavanones from citrus pomace: Obtention of natural compounds with anti-virulence and anti-adhesive effect against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. *Food Control*, 120, 107525. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107525>
- Bhatwalkar, S. B., Mondal, R., Babu, S., & Krishna, N. (2021). Antibacterial properties of organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). *Frontiers in Microbiology*, 12, 613077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.613077>
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C. H., Nwachukwu, I. D., & Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: Chemistry and biological properties. *Molecules*, 19(8), 12591–12618. <https://doi.org/10.3390/molecules190812591>
- Cavalcanti, V. P., Aazza, S., Bertolucci, S. K. V., Rocha, J. P. M., Coelho, A. D., Oliveira, A. J. M., Mendes, L. C., Pereira, M. M. A., Morais, L. C., Forim, M. R., et al. (2021). Solvent mixture optimization in the extraction of bioactive compounds and antioxidant activities from garlic (*Allium sativum* L.). *Molecules*, 26(19), 6026. <https://doi.org/10.3390/molecules26196026>
- Davis, W. W., & Stout, T. R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. II. Novel procedure offering improved accuracy. *Applied Microbiology*, 22(4), 666–670. <https://doi.org/10.1128/aem.22.4.666-670.1971>

- Dawwam, G. E., Shemy, M. T. A., & Demerdash, A. S. E. (2022). Green synthesis of cellulose nanocrystal/ZnO bio-nanocomposites exerting antibacterial activity and downregulating virulence toxigenic genes of food-poisoning bacteria. *Scientific Reports*, 12, 21087. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21087-6>
- Đermić, D., Ljubić, S., Matulić, M., Procino, A., Feliciello, M. C., Ugarković, Đ., & Feliciello, I. (2023). Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) without the need for prior removal of DNA. *Scientific Reports*, 13(1), 38383. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38383-4>
- Dranca, F., & Oroian, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.008>
- Friedrich, M. J., Kinsey, N. E., Vila, J., & Kadner, R. J. (1993). Nucleotide sequence of a 13.9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*: The presence of fimbrial biosynthetic genes. *Molecular Microbiology*, 8(3), 543–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01599.x>
- Gabriel, T., Vestine, A., Kim, K. D., Kwon, S. J., Sivanesan, I., & Chun, S. C. (2022). Antibacterial activity of nanoparticles of garlic (*Allium sativum*) extract against different bacteria such as *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Applied Sciences*, 12(7), 3491. <https://doi.org/10.3390/app12073491>
- Gharieb, R. M., Tartor, Y. H., & Khedr, M. H. E. (2015). Non-typhoidal *Salmonella* in poultry meat and diarrhoeic patients: Prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains. *Gut Pathogens*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0081-1>
- Hugas, M., & Beloeil, P. A. (2014). Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union - Progress over the last ten years. *Eurosurveillance*, 19(19), 20804. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.19.20804>
- Ismail, N. I., Hashim, Y. Z. H. Y., Jamal, P., MohdSalleh, H., & Othman, R. (2014). Ultrasonic-assisted extraction of thiols from garlic bulbs. *Advances in Environmental Biology*, 8(3), 725–728.
- [ISO] International Organization for Standardization. (2007). *ISO 7218:2007 tentang Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*. Volume ke-2013. Switzerland. <https://www.iso.org>.
- Kaur, R., Tiwari, A., Manish, M., Maurya, I. K., Bhatnagar, R., & Singh, S. (2021). Common garlic (*Allium sativum* L.) has potent Anti-*Bacillus anthracis* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113230. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113230>
- Khan, S., Beattie, T. K., & Knapp, C. W. (2017). The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology*, 26(2), 283–292. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1762-y>
- Klumpp, S., Zhang, Z., & Hwa, T. (2009). Growth-rate dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell*, 139(7), 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.001>
- Kshirsagar, M., Dodamani, A., Karibasappa, G., Vishwakarma, P., Vathar, J., Sonawane, K., Jadhav, H., Khobragade, V. (2018). Antibacterial activity of garlic extract on cariogenic bacteria: An in vitro study. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*, 39(3), 165. https://doi.org/10.4103/ayu.ayu_193_16
- Kureljušić, J., Žutić, J., Kureljušić, B., Rokvić, N., Tasić, A., Ljubojević Pelić, D., & Vesković Moračanić, S. (2021). *Salmonella* - Foodborne pathogen and antimicrobial resistance. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 854, 012049. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/854/1/012049>
- Kwon, Y. W., & Lee, S. Y. (2020). Effects of antibiotics at sub-minimal inhibitory concentrations on the morphology of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. *Oral Biology Research*, 44(1), 1–7. <https://doi.org/10.21851/obr.44.01.202003.1>
- Lee, S. W., & Musa, N. (2008). Inhibition of *Edwardsiella tarda* and other fish pathogens by *Allium sativum* L. (*Alliaceae*) extract. *American Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 3(5), 692–696.
- Liaqat, A., Zahoor, T., Atif Randhawa, M., & Shahid, M. (2019). Characterization and antimicrobial potential of bioactive components of sonicated extract from garlic (*Allium sativum*) against foodborne pathogens. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(5), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13936>
- Loghmanifar, S., Roozbeh Nasiraie, L., Nouri, H., & Jafarian, S. (2022). Optimization of ultrasound-assisted garlic extraction using response surface methodology. *Scientific Reports*, 29(6), 3188–

3197.
<https://doi.org/10.24200/sci.2022.58130.5581>
- Magryś, A., Olender, A., & Tchórzewska, D. (2021). Antibacterial properties of *Allium sativum* L. against the most emerging multidrug-resistant bacteria and its synergy with antibiotics. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2257–2268. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02248-z>
- Mehta, N., S J., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Khatkar, S. K., Khatkar, A. B., Pathak, D., Kaka, U., & Sazili, A. Q. (2022). Ultrasound-assisted extraction and the encapsulation of bioactive components for food applications. *Foods*, 11(19), 1–35. <https://doi.org/10.3390/foods11192973>
- Melati, R. P. (2022). *Identifikasi dan sekuensing isolat Salmonella spp. asal karkas ayam dengan marker gen invasi* [Tesis, IPB University]. IPB Repository. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/111507>
- Muhammad, M., Yusuf, U., Ahmad, J., & Kloy, A. (2020). A comprehensive review study of the antibacterial properties of garlic (*Allium sativum*). *Biological Sciences*, 9(2), 11–15. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14103.60326>
- Müller, A., Eller, J., Albrecht, F., Prochnow, P., Kuhlmann, K., Bandow, J. E., Slusarenko, A. J., & Leichert, L. I. O. (2016). Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 291(22), 11477–11490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702308>
- Nagella, P., Thiruvengadam, M., Ahmad, A., Yoon, J. Y., & Chung, I. M. (2014). Composition of polyphenols and antioxidant activity of garlic bulbs collected from different locations of Korea. *Asian Journal of Chemistry*, 26(3), 897–902. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.16143A>
- Namimatsu, T., Asai, T., Osumi, T., Imai, Y., & Sato, S. (2006). Prevalence of the virulence plasmid in *Salmonella Typhimurium* isolates from pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(2), 187–188. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.187>
- Narimisa, N., Amraei, F., Kalani, B. S., Mohammadzadeh, R., & Jazi, F. M. (2020). Effects of sub-inhibitory concentrations of antibiotics and oxidative stress on the expression of type II toxin-antitoxin system genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.005>
- Nurjanah, S., Rahayu, W. P., & Al Mutaqin, L. (2019). Detection method for *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* using real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Engineering and Technology*, 7(4), 302. <https://doi.org/10.14419/ijet.v7i4.14.27661>
- Oktaviani, S. (2022). Aktivitas ekstrak air bawang putih terhadap *Salmonella Typhimurium* dan ekspresi gen patogenitas STM. [Skripsi, IPB, Bogor].
- Paula, D. P., & Andow, D. A. (2021). Melting curve analysis for detection and identification of ghost parasitoids in host carcasses a month after host death. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(9), 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13626>
- Robertson, J., Schonfeld, J., Bessonov, K., Bastedo, P., & Nash, J. H. E. (2023). A global survey of *Salmonella* plasmids and their associations with antimicrobial resistance. *Microbial Genomics*, 9(5), 1–14. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001002>
- Romes, N. B., Hamid, M. A., Hashim, S. E., & Wahab, R. A. (2019). Statistical modelling of ultrasonic-aided extraction of *Elaeis guineensis* leaves for better-quality yield and total phenolic content. *Indonesian Journal of Chemistry*, 19(3), 811–826. <https://doi.org/10.22146/ijc.41603>
- Rouf, R., Jamal, S., Kumer, D., & Torequl, M. (2020). Antiviral potential of garlic (*Allium sativum*) and its organosulfur compounds: A systematic update of pre-clinical and clinical data. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 219–234. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.006>
- Rowlands, R. E. G., Ristori, C. A., Ikuno, A. A., Barbosa, M. L., Jakabi, M., Franco, B. D. G. de M. (2014). Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from food associated or not with salmonellosis in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(6), 461–467. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000600001>
- Salimi, A., Rahmani, S., & Sharifi-Zarchi, A. (2023). InterOpt: Improved gene expression quantification in qPCR experiments using weighted aggregation of reference genes. *iScience*, 26(10), 107945. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107945>
- Sanjaya, Y. A., Tola, P. S., & Rahmawati, R. (2022). Ultrasound-assisted extraction (UEA) sebagai metode potensial untuk meningkatkan ekstraksi senyawa bioaktif. *ICES-ET*, 2(1), 191–198. <http://dx.doi.org/10.11594/nstp.2022.2729>
- Savairam, V. D., Patil, N. A., Borate, S. R., Ghaisas, M. M., & Shete, R. V. (2023). A review of its important pharmacological activities. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 8, 100283. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100283>

- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria. *Water*, 12, 3313–3330. <https://doi.org/10.3390/w12123313>
- Shang, A., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Tang, G. Y., Corke, H., Mavumengwana, V., & Li, H. B. (2019). Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*, 8(7), 1–31. <https://doi.org/10.3390/foods8070246>
- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashid, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H., et al. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>
- Skyberg, J. A., Logue, C. M., & Nolan, L. K. (2006). Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases*, 50(1), 77–81. <https://doi.org/10.1637/7417.1>
- Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., & Vágvölgyi, C. (2020). Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. *Antioxidants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/antiox9020165>
- Tavares, L., Santos, L., & Zapata Noreña, C. P. (2021). Bioactive compounds of garlic: A comprehensive review of encapsulation technologies, characterization of the encapsulated garlic compounds, and their industrial applicability. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 232–244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.019>
- Thung, T. Y., Radu, S., Mahyudin, N. A., Rukayadi, Y., Zakaria, Z., Mazlan, N., Tan, B. H., Lee, E., Yeoh, S. L., Chin, Y. Z., et al. (2018). Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serovars from retail beef in Selangor, Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02697>
- Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Benchmark agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: Comparison with spectrophotometry, fluorometry, and qPCR. *Biotechniques*, 72(4), 155–158. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>
- Yang, X., Sha, K., Xu, G., Tian, H., Wang, X., Chen, S., Wang, Y., Li, J., Chen, J., & Huang, N. (2016). Subinhibitory concentrations of allicin decrease uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) biofilm formation, adhesion ability, and swimming motility. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 979. <https://doi.org/10.3390/ijms17070979>
- Yeop, A., Sandanasam, J., Pan, S. F., Abdulla, S., Yusoff, M. M., & Gimbin, J. (2017). The effect of particle size and solvent type on the gallic acid yield obtained from *Labisia pumila* by ultrasonic extraction. *MATEC Web of Conferences*, 111, 1–5. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201711102008>
- Yosua, A. (2018). Deteksi *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Typhimurium, dan *Salmonella* Enteritidis menggunakan polymerase chain reaction (PCR). [Skripsi, Institut Pertanian Bogor].
- Yulian, R., Narulita, E., Iqbal, M., Sari, D. R., Suryaningsih, I., & Ningrum, D. E. A. F. (2020). Detection of virulence and specific genes of *Salmonella* sp. indigenous from Jember, Indonesia. *Biodiversitas*, 21(7), 2889–2892. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210703>
- Zadeh, M. G., Bidhendi, S. M., & Ashrafi, F. (2020). Comparative study of garlic extract effect on the expression of genes involved in quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and the antibiotic tobramycin. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 15(1), 107–120. <https://doi.org/10.30699/ijmm.15.1.107>