

**EFEK PENAMBAHAN FRAKSI POLAR F24-F28 EKSTRAK METANOL MENIRAN
(*Phyllanthus niruri*) TERHADAP DAYA HAMBAT AMOKSISILIN DAN
KLORAMFENIKOL PADA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli***

Daan Anisa Fadilah Iswary, Faisal, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Antibiotik digunakan untuk menanggulangi infeksi bakteri, namun penggunaan yang tidak rasional dapat memicu resistensi. Kombinasi herbal meniran (*Phyllanthus niruri*) dan antibiotik perlu didalami lebih lanjut karena dapat menjadi alternatif yang tepat dalam rangka menurunkan angka resistensi. Ekstrak kasar dari meniran diketahui dapat meningkatkan kerja antibiotik, tetapi senyawa aktif yang bekerja belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk menilai interaksi pada kombinasi fraksi 24-28 dengan amoksisilin atau kloramfenikol terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.

Metode: Fraksi 24-28 didapatkan dari proses fraksinasi ekstrak metanol meniran dengan eluen etil asetat 12,5 ml:metanol 37,5 ml. Uji fitokimia pada fraksi menggunakan plat kromatografi lapis tipis yang disemprot dengan reagen dragendorff, $FeCl_3$, dan formaldehid. Uji daya hambat fraksi secara tunggal dan kombinasi dengan antibiotik dilakukan dengan metode Kirby-Bauer dan dinilai berdasarkan metode Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST).

Hasil: Uji fitokimia didapatkan senyawa alkaloid pada fraksi 26 dan 27, steroid dan terpenoid pada fraksi 25-28, dan senyawa fenol pada fraksi 24-28. Secara tunggal, fraksi 24-28 memiliki zona hambat pada *S. aureus* dengan diameter berkisar antara 11-13 mm. Namun, tidak didapatkan zona hambat pada *E. coli*. Kombinasi penambahan fraksi 24-28 dengan amoksisilin dan kloramfenikol pada *S. aureus* dan *E. coli* tidak berbeda secara signifikan.

Kesimpulan: Fraksi 24-28 memiliki senyawa antibakteri terhadap *S. aureus*. Pada uji kombinasi fraksi 24-28 dengan amoksisilin atau kloramfenikol didapatkan interaksi *not distinguishable* baik terhadap *S. aureus* maupun *E. coli*.

Kata Kunci: Amoksisilin, Kloramfenikol, *Phyllanthus niruri*, L., Uji Fitokimia, Uji Zona Inhibisi

**THE EFFECT OF POLAR FRACTION F24-F28 MENIRAN (*Phyllanthus
niruri*) METHANOL EXTRACT ADDITION TOWARD AMOXICILLIN
AND CHLORAMPHENICOL INHIBITION ON *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia
coli***

Daan Anisa Fadilah Iswary, Faisal, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Antibiotics are used to treat the bacteria infection. However, the irrational use of antibiotics can trigger resistancy. The Herbal combination such as meniran (*Phyllanthus niruri*) and antibiotics needs to be thoroughly observed because it can be a proper alternative to reduce resistancy. Crude extracts of meniran is known to enhance the effectiveness of antibiotics. However, active compounds that work have not been known yet. This research aimed to assess the interaction of a combination of fractions 24-28 with amoxicillin and chloramphenicol against *S. aureus* and *E. coli*.

Method: Fraction 24-28 was obtained from methanolic extract process of meniran with 12.5 ml of ethyl acetate: 37.5 ml of methanol eluent. Phytochemical tests of the fractions used thin layer chromatography plates sprayed with dragendorff, $FeCl_3$, and formaldehyde reagents. Single fraction inhibition test and combination with antibiotics were conducted by the Kirby-Bauer method and assessed based on the Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST) method.

Result: Phytochemical test obtained alkaloids in fractions of 26 and 27, steroids and terpenoids in fractions of 25-28, and phenol compounds in fractions of 24-28. fractions of 24-28 singly had inhibition zone in *S. aureus* with a diameter ranging from 11-13 mm. However, no inhibitory zones were found in *E. coli*. The combination of the addition of fractions 24-28 with amoxicillin and chloramphenicol in *S. aureus* and *E. coli* are not different significantly.

Conclusion: Fraction of 24-28 has antibacterial compounds against *S. aureus*. The combination of fraction 24-28 with amoxicillin or chloramphenicol, showed the interaction to *S. aureus* and *E. coli* is not distinguishable.

Key Words: Amoxicillin, Chloramphenicol, *Phyllanthus niruri*, L., Phytochemical Tests, Zone Of Inhibition

*Correspondence:

Rio Risandiansyah

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Address : Jl. MT Haryono 193, Malang City, East Java, Indonesian, 65145

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan mikroorganisme patogenik yang berproliferasi di dalam tubuh. Penyebab infeksi terbanyak salah satunya disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* dapat menjadi penyebab berbagai macam penyakit seperti endokarditis infektif, bakteremia, osteoartikular, kulit dan jaringan lunak, dan lain-lain¹. Sedangkan *Escherichia coli* paling sering menyebabkan infeksi saluran kemih dengan angka kejadian sebesar 90%, peritonitis akut sebesar 50%, meningitis sebesar 28,5%, *traveler's diarrhea* sebesar 11-15%^{2,3}.

Cara dalam menanggulangi infeksi bakteri yaitu menggunakan antibiotik dengan pertimbangan klinis yang sesuai untuk memenuhi rasionalitas, agar keamanan dan efektivitasnya terjamin. Ketika antibiotik tidak digunakan secara tepat, maka dapat timbul berbagai masalah kesehatan seperti resistensi antibiotik⁴. Namun, di Indonesia sekitar 35,2% rumah tangga masih menyimpan obat untuk swamedikasi dan diantara obat-obatan tersebut, 27,8 persen merupakan antibiotik. Salah satu antibiotik yang paling banyak digunakan pada swamedikasi yaitu amoksisilin sebanyak 54,34%, dengan ampisilin dan siprofloksasin di urutan kedua dan ketiga⁵. Kloramfenikol selama ini digunakan sebagai *drug of choice* penyakit demam tifoid yang merupakan penyakit endemik di Indonesia⁶.

Penduduk Indonesia yang mengonsumsi herbal sebanyak 59,12 % untuk pengobatan dengan penggunaan tumbuhan meniran sebanyak 13,93 % atau pada urutan keempat terbanyak setelah jahe, kencur, dan temulawak⁷.

Penelitian sebelumnya di laboratorium UNISMA menemukan bahwa kombinasi ekstrak kasar meniran (*Phyllanthus niruri*) dengan antibiotik amoksisilin bersifat sinergis pada *S. aureus* dan antagonis pada *E. coli*. Sedangkan kombinasi dengan kloramfenikol bersifat aditif baik pada *S. aureus* maupun *E. coli*⁸. Hal ini diduga berkaitan dengan adanya senyawa aktif yang berinteraksi dengan antibiotik yang diberikan.

Meskipun demikian, belum diketahui senyawa spesifik yang mempengaruhi aktivitas herbal meniran pada kinerja dari dua antibiotik tersebut. Pada penelitian ini, dilakukan fraksinasi, uji kromatografi lapis tipis dan fitokimia yang bertujuan untuk memisahkan dan mengetahui jenis senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak meniran. Fraksi yang didapatkan akan diukur *zone of inhibition* (ZOI) nya untuk menilai respon interaksinya dengan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium *in vitro*. Waktu penelitian mulai dari Januari hingga April tahun 2019 di Laboratorium Herbal Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNISMA

Pembuatan Ekstrak Metanolik Meniran

Pembuatan ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri*) dilakukan dengan metode maserasi diawali dengan mempersiapkan simplisia dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). 200 gram simplisia dan 2000 ml metanol pro analisis 96% dipersiapkan dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer masing-masing 40 gram dan 400 ml. Erlenmeyer yang sudah berisi campuran simplisia dan metanol ditutup dengan aluminium foil dan dimasukkan ke dalam *shaker water bath* dengan kecepatan 4,5 selama 24 jam. Setelah 24 jam, hasil ekstrak disaring menggunakan corong *buchner* dan 3 lembar kertas saring, filtrat yang telah didapat di evaporasi dengan menggunakan *Rotary vacuum evaporator* dalam suhu 55°C dan kecepatan 4. Evaporasi dilakukan hingga semua metanol dalam filtrat menguap. Selanjutnya hasil dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama 3 hari hingga ekstrak mengental. Ekstrak yang telah kental disimpan dalam lemari es.

Metode Fraksinasi Meniran

Fraksinasi merupakan suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan tingkat kepolaran dari pelarut. Fraksinasi pada penelitian ini menggunakan dua kromatografi kolom dengan resin silika tiap kolom sebagai fasa diam dan pelarut etil asetat dan metanol sebagai fasa gerak. Urutan susunan fraksi dari bawah yaitu kertas saring, *glass wool*, silika yang mengisi $\pm 2/3$ kolom, campuran herbal 2 gram dengan silika 3 gram, dan silika 1,5 gram. Setelah disusun, pelarut dimasukkan dalam kolom dengan urutan: (1) 50 ml etil asetat; (2) 45 ml etil asetat: 5 ml metanol; (3) 37,5 ml etil asetat: 12,5 ml metanol; (4) 25 ml etil asetat: 25 ml metanol; (5) 12,5 ml etil asetat: 37,5 ml metanol; (6) 50 ml metanol; (7) 37,5 ml metanol: 12,5 ml aquadest. Fraksi 24-28 didapatkan dari pelarut kelima.

Fraksi ditampung dengan menggunakan gelas ukur. Setelah terisi 10 ml, fraksi dalam gelas ukur dipindahkan ke dalam vial. Selain itu, pergantian juga dilakukan tiap warna tetesan berubah meskipun volume belum mencapai 10 ml. Fraksi dalam vial ditimbang, dan dituang dalam eppendorf sebanyak 1 ml.

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji kromatografi lapis tipis untuk mengkonfirmasi hasil secara kualitatif. KLT dilakukan dengan

menggunakan F254 Silica plate dengan eluen etil asetat 3 ml dan metanol 7 ml. Plat KLT yang telah diaktivasi ditetes dengan menggunakan *yellow tip* sebanyak 50-100 μ l. Setelah kering, plat KLT dimasukkan dalam chamber berisi eluen dan didiamkan hingga pelarut naik sampai batas garis atas plat. Hasilnya diamati dibawah sinar UV. Rf didapatkan dengan membagi jarak tempuh zat dengan jarak tempuh pelarut.

Uji Fitokimia

Uji fitokimia digunakan untuk skrining terhadap tanaman untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman tersebut. Uji yang dilakukan menggunakan KLT yang telah ditotoli fraksi herbal. Bagian fraksi yang menunjukkan adanya kandungan senyawa aktif diamati dan dicatat. Uji fitokimia yang pertama dilakukan adalah untuk menentukan kandungan alkaloid, dengan menyemprotkan larutan *dragendorff* pada KLT yang sudah ditotol fraksi 24-28 ekstrak metanolik meniran. Jika didapati perubahan warna menjadi coklat-jingga/oranyemerah/coklat berlatar belakang kuning, maka terdapat kandungan alkaloid⁹.

Untuk mendeteksi kandungan fenol, digunakan reagen *ferric chloride* (FeCl_3). KLT yang sudah di semprot dipanaskan hingga 110°C dalam waktu 10 menit dan diamati perubahan warnanya. Hasil positif jika didapatkan spot berwarna hijau, merah, ungu, biru, dan hitam pekat⁹.

Reagen *formaldehyde* digunakan untuk mendeteksi kandungan steroid dan terpenoid. KLT yang telah disemprot dengan reagen tersebut didiamkan di suhu ruang hingga kering. Jika didapatkan spot berwarna coklat, maka hasil dianggap positif mengandung steroid dan terpenoid¹⁰.

Pembuatan Larutan Antibiotik

Antibiotik yang digunakan dalam penelitian disiapkan, yaitu amoksisilin dan kloramfenikol 100 mg, selanjutnya di larutkan dengan 100 ml aquadest steril, pelarutan dilakukan sesuai dengan antibiotik yang digunakan secara terpisah.

Pembuatan Cawan Petri untuk Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode *Pour Plate*

Inokulum dipersiapkan menggunakan spektrofotometer. Koloni isolat bakteri dari media padat diambil dengan oshe dan dimasukkan kedalam NaCl 0,9% pada tabung reaksi hingga warnanya keruh. Bakteri dihomogenisasikan dengan menggunakan vortex mixer. Dengan menggunakan mikropipet, 3 ml sampel bakteri diambil, dimasukkan kedalam kuvet, dan dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Setelah mencatat nilai absorbansi, dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,9% steril. Pengenceran menggunakan rumus dengan target OD600nm adalah 0,2, dengan rumus:

$$\text{faktor dilusi} = \frac{\text{abs.sampel}}{\text{abs.target (0,2)}} \times \text{vol.sampel}$$

Setelah itu, dilakukan pengujian aktivitas antimikroba pada media agar. Media padat dibuat dengan perbandingan nutrisi agar dan aquadest 20g/L, dan dimasukkan ke autoklaf untuk sterilisasi. Selanjutnya, suhu diukur dengan menggunakan termometer cahaya saat sudah steril. Jika suhu media dibawah 50°C , inokulum 1% dimasukkan dari media (10 ml/ 1liter media) dan dicampur hingga rata dengan menggerakkan botol media. Selanjutnya agar sebanyak ± 20 -25 ml dituang pada cawan petri hingga mengisi setengah tinggi cawan.

Zone of Inhibition (ZOI)

Tahapan pertama dalam melakukan uji ZOI yaitu persiapan fraksi herbal meniran (*Phyllanthus niruri*), larutan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol, dan media agar yang telah diinokulasi bakteri *S.aureus* dan *E.coli*. Lubang sumuran sebanyak 10 dibuat pada media agar menggunakan alat *cork borer* berukuran 6 mm. Sampel yang diujikan dimasukkan sebanyak 30-50 μ l dengan menggunakan mikropipet, dan dibiarkan di Laminar air flow/ Biosafety cabinet dengan kondisi setengah terbuka selama 30-60 menit. Setelah itu, dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37° selama 18-24 jam. Bahan coba dikatakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri jika terdapat zona bening di sekitar lubang. Pengukuran zona bening dengan menggunakan penggaris dengan satuan mm. Jika diameter ≤ 5 mm, tingkat kekuatan daya hambat dinyatakan lemah, 5-10 mm termasuk sedang, 10-20 mm digolongkan kuat, dan dinyatakan sangat kuat apabila diameternya >20 mm¹¹.

Analisa Data Statistik

Hasil dari ZOI kombinasi diukur menggunakan penggaris dengan ketelitian mm dan dianalisa menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* agar didapatkan rerata dan standar deviasi. Uji Statistik menggunakan uji non parametrik *Mann-Whitney test* agar terlihat perbedaan antara ZOI tunggal dan kombinasi pada tiap fraksi herbal. Hasil ZOI yang didapatkan, diinterpretasi menurut metode *Ameri-Ziaei double antibiotic synergism test (AZDAST)*. Jika diameter zona bening pada kombinasi herbal dan antibiotik (A+B) lebih besar dari herbal tunggal (A) dan antibiotik tunggal (B), serta lebih besar atau lebih kecil dari herbal kombinasi (AA) dan antibiotik kombinasi (BB) maka termasuk sinergis. Jika A+B sama dengan AA dan atau BB, termasuk aditif. Apabila A+B lebih kecil dari A atau B, maka disebut antagonis. Sedangkan jika A atau B sama dengan nol, A+B lebih besar dari A dan B, dan lebih besar atau lebih kecil dari AA dan atau BB, maka termasuk potensiasi. Apabila A+B sama dengan salah satu dari A atau B maka tidak dapat dibedakan (*not distinguishable*)¹².

HASIL

Hasil Uji Fitokimia

No. fraksi	Reagent (senyawa aktif)		
	Alkaloid (Rf)	Fenol (Rf)	Steroid dan terpenoid (Rf)
F24	-	+ (0,65)	-
F25	-	+ (0,65)	+ (0,76)
F26	+ (0,6; 0,78)	+ (0,07; 0,6)	+ (0,81)
F27	+ (0,6; 0,81)	+ (0,07; 0,6)	+ (0,78)
F28	-	+ (0,05; 0,47)	+ (0,8)

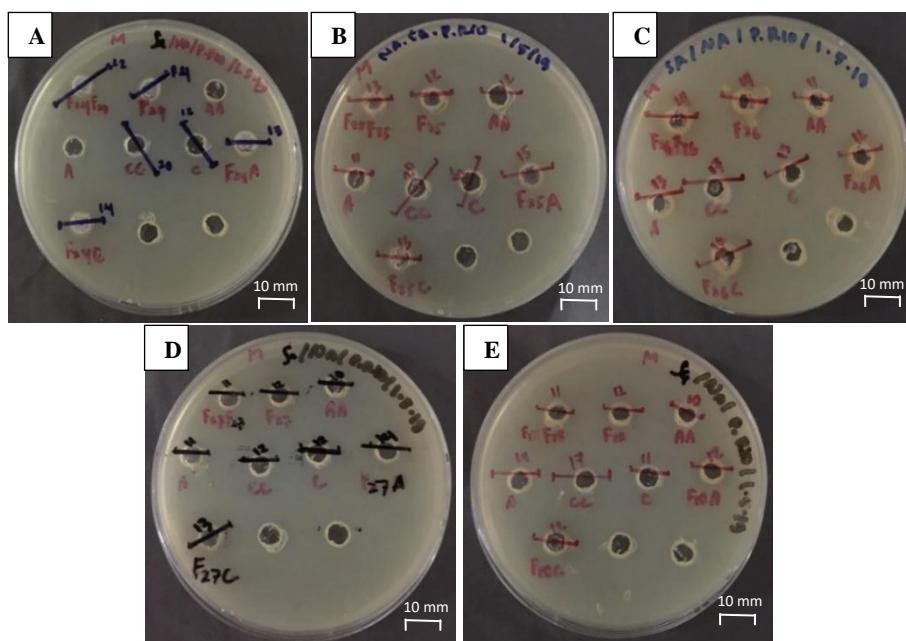
Uji fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif pada fraksi herbal meniran. Hasil

Tabel 1. Hasil Pengujian Kandungan Senyawa Aktif pada KLT *Spray*

Keterangan: Rf = Jarak tempuh substansi / Jarak tempuh pelarut (3,8cm)

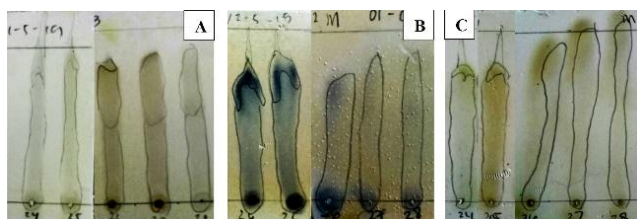
Pada fraksi 24 didapatkan hasil fraksi positif mengandung fenol. Fraksi 25 mengandung fenol dan terpenoid. Pada fraksi 26 dan 27 didapatkan hasil

positif ketika disemprot dengan ketiga reagent, yang menandakan bahwa fraksi tersebut mengandung alkaloid, fenol, steroid, dan



Gambar 2. Hasil Pengujian ZOI tunggal dan kombinasi Fraksi Meniran dan Antibiotik pada Bakteri *S.aureus*; **A.** Fraksi 24 ekstrak metanolik Meniran, F24F24= Fraksi 24 dosis 30µl, F24= Fraksi 24 dosis 15µl, AA= Amoksisilin dosis 30µl, A= Amoksisilin dosis 15µl, CC= Kloramfenikol dosis 30µl, C= Kloramfenikol dosis 15µl, F24A= Kombinasi fraksi 24 dan amoksisilin, F24C= Kombinasi fraksi 24 dan kloramfenikol; **B.** Fraksi 25 ekstrak metanolik Meniran; **C.** Fraksi 26 ekstrak metanolik Meniran; **D.** Fraksi 27 ekstrak metanolik Meniran; **E.** Fraksi 28 ekstrak metanolik Meniran

yang didapatkan pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) fraksi 24-28 meniran dapat dilihat pada gambar 1 dan tabel 1 berikut :



Gambar 1. Hasil Perubahan warna pada KLT *Spray* Fraksi 24-28 meniran dengan masing-masing reagen; **A.** Reagen dragendorff menunjukkan perubahan warna menjadi coklat; **B.** Reagen $FeCl_3$ menunjukkan perubahan warna menjadi biru; **C.** Reagen formaldehyd menunjukkan perubahan warna menjadi coklat

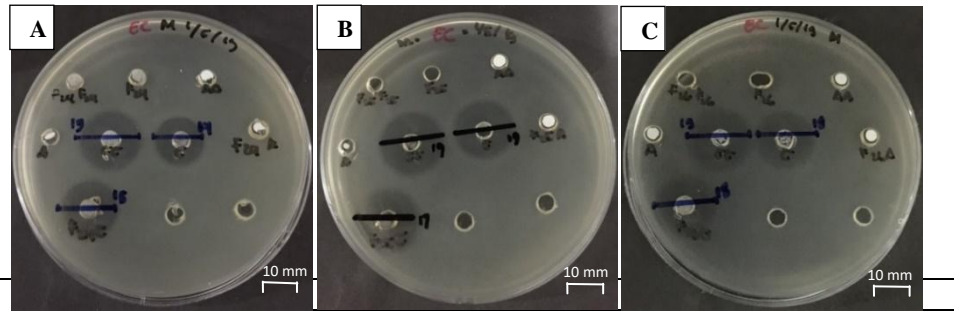
terpenoid. Sedangkan fraksi 28 mengandung senyawa fenol, steroid, dan terpenoid.

Nilai Rf (*Retention factor*) digunakan sebagai parameter untuk menilai distribusi komponen dan pergerakan komponen senyawa terhadap pelarut. Jika didapatkan nilai Rf yang sama pada KLT yang sama, maka senyawa dinyatakan identik. Nilai Rf lebih besar pada senyawa yang kurang polar dan berinteraksi dengan adsorbent polar dari plat KLT. Semakin besar nilai Rf, maka semakin besar jarak senyawa tersebut bergerak pada plat KLT.

Hasil Uji Zona Inhibisi pada Pengujian Fraksi 24-28 Meniran Secara Tunggal dan Kombinasi dengan Antibiotik pada *S.aureus* dan *E. coli*

Uji ZOI dilakukan dengan cara mencampurkan fraksi ekstrak meniran dengan masing-masing antibiotik (amoksisilin dan kloramfenikol). Hasil ZOI kombinasi terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.*

E. coli dapat dilihat pada tabel 2, gambar 2, dan gambar 3.



Gambar 3. Hasil Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanolik Meniran dengan Amoksisilin dosis 15µl, Kloramfenikol dosis 15µl, amoksisilin, F24C= Kombinasi ekstrak metanolik Meniran dan amoksisilin

Hasil Uji Zona Inhibisi Tunggal Fraksi 24-28 Meniran

Pada gambar 2 dan tabel 2 dapat disimpulkan bahwa semua fraksi memiliki zona inhibisi terhadap bakteri *S. aureus*. Fraksi 24 dan 26 yang member

No fraksi	Sampel	Zona Inhibisi (mm)	Jenis Interaksi
24	F24	14±1	Not Distinguishable
	C	14±1	
	A	14±1	
	F24C	14±1	
	F24A	14±1	
25	F25	12±1	Not Distinguishable
	C	12±1	
	F25C	12±1	
	F25A	13±2	
26	F26	13±1	Not Distinguishable
	C	13±3	
	A	8±7	
	F26C	15±1	
27	F27	11±1	Not Distinguishable
	C	11±1	
	A	11±1	
	F27C	13±1	
28	F28	12±0	Not Distinguishable
	C	12±1	
	A	12±2	
	F28C	12±1	
	F28A	13±1	

ikan zona terbesar yaitu 13 mm. Sedangkan pada bakteri *E. coli*, kelima fraksi tidak menunjukkan aktivitas antibakteri.

Keterangan: Fx= uji zoi tunggal fraksi Meniran dosis 15µl; C= uji zoi tunggal kloramfenikol dosis 15µl; A= uji zoi tunggal amoksisilin dosis 15µl; FxC= uji zoi kombinasi fraksi Meniran dan kloramfenikol; FxA= uji zoi kombinasi fraksi Meniran dan amoksisilin

Tabel 2. Rerata (T) Meniran dengan A

Hasil Uji Zona Inhibisi Kombinasi Antara Fraksi 24-28 Meniran dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *S.aureus*

Interaksi yang ada pada kombinasi fraksi herbal dengan antibiotik ini dinilai dengan metode AZDAST. Gambar 2 dan Tabel 2 di atas menunjukkan hasil uji kombinasi antara fraksi Meniran dan amoksisilin pada bakteri *S.aureus*. Setelah dilakukan pengukuran diameter zona inhibisi, dilanjutkan dengan uji statistik. Hasil pada uji statistik non parametrik *Mann-Whitney Test*, fraksi 24 didapatkan hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$). Interaksi pada fraksi 24 yang dikombinasi dengan amoksisilin dikategorikan *not distinguishable*. Sedangkan fraksi 25-28 didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$), sehingga interaksi antara fraksi tersebut dengan amoksisilin pada bakteri *S.aureus* dikategorikan *not distinguishable*.

Kombinasi antara fraksi Meniran dan kloramfenikol pada bakteri *S.aureus* memiliki hasil tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) pada uji statistik *Mann-Whitney Test*. Sehingga berdasarkan hasil di atas kombinasi fraksi 24-28 Meniran dengan kloramfenikol memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.

Hasil Uji Zona Inhibisi Tunggal Fraksi 24-28 Meniran Terhadap Bakteri *E.coli*

Pada pengujian zona inhibisi tunggal fraksi meniran didapatkan hasil bahwa kelima fraksi tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* baik pada dosis 15 μ l (Fx) maupun dengan dosis 30 μ l (FxFx).

Hasil Uji Zona Inhibisi Kombinasi Antara Fraksi 24-28 Meniran dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *E. coli*

Berdasarkan gambar 3 dan tabel 2 di atas hasil uji kombinasi fraksi 24-28 meniran dengan antibiotik amoksisilin tidak didapatkan zona inhibisi, baik dengan dosis 30 μ l maupun 15 μ l. Sehingga data hasil kombinasi fraksi herbal meniran dengan amoksisilin pada bakteri *E.coli* tidak dilakukan perhitungan.

Hasil pengujian fraksi 24-28 menunjukkan bahwa zona inhibisi hanya terdapat pada sumuran CC, C, dan FxC. Sedangkan sumuran lainnya tidak memiliki zona inhibisi terhadap bakteri *E.coli*. Hasil studi menunjukkan hanya antibiotik kloramfenikol yang memberikan zona terhadap bakteri *E. coli*.

Uji statistik dengan *Mann-Whitney test* pada ZOI menunjukkan kombinasi antara fraksi 24-28 meniran dan kloramfenikol pada *E.coli* didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) dibandingkan dengan antibiotik tunggal. Sehingga, berdasarkan hasil di atas kombinasi fraksi 24-28 Meniran dengan kloramfenikol memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.

PEMBAHASAN

Analisa Kandungan Senyawa Aktif Fraksi 24-28 Meniran

Pada hasil pengujian fitokimia fraksi 24-28 meniran didapatkan bahwa kelima fraksi memiliki kandungan senyawa aktif didalamnya. Pada pengujian kandungan alkaloid dengan reagen *dragendorf*, didapatkan spot berwarna coklat pada fraksi 26 dan 27 yang mengindikasikan bahwa hasil tersebut positif. Sedangkan pada penyemprotan reagen $FeCl_3$, didapatkan hasil positif pada fraksi 24-28 yang ditandai dengan spot berwarna biru kehitaman. Hal ini menunjukkan bahwa kelima fraksi tersebut diindikasikan mengandung fenol. Pada pengujian kandungan steroid dan terpenoid, dilakukan dengan penyemprotan reagen *formaldehyde* di plat KLT. Hasil pengujian didapatkan positif pada fraksi 25-28 yang berarti bahwa fraksi tersebut mengandung steroid dan terpenoid.

Hasil tersebut mendukung penelitian sebelumnya mengenai senyawa pada tanaman meniran yang memiliki berbagai kandungan senyawa aktif antara lain alkaloid dan turunannya yaitu *Viroallosecurin* dan *Securinine*, senyawa fenol dan turunannya yaitu polifenol atau tanin, *flavone*, *4',5,7-triethoxy-3,3',6-trimethoxy*, dan *coumarin*, turunan-turunan steroidal triterpenoid yaitu *6,7-epoxy pregn-4-ene-9,11,18-triol-3,20-dione*, *11,18-diacetate*, *7,8-epoxy lanostan-11-ol,3-acetoxy*, serta turunan terpenoid seperti saponin, *cardiac glycosides*, *p-Cymene*, dan *triterpenoid 17-(1,5-Dimethylhexyl)-6-hydroxy-5-methylestr-9-en-3-yl acetate*^{13,14,15,16}.

Nilai *Rf* (*Retention factor*) menunjukkan distribusi dan pergerakan senyawa terhadap pelarut. Semakin kecil nilai *Rf*, semakin pelan senyawa bergerak naik pada plat KLT, maka kepolaran senyawa semakin bertambah. Jika nilai *Rf* yang didapatkan serupa, maka senyawa dinyatakan identik. Pada penghitungan nilai *Rf* didapatkan hasil senyawa identik yang membagi alkaloid menjadi dua jenis, fenol tiga jenis, dan satu jenis senyawa steroid dan terpenoid.

Daya Hambat Tunggal Fraksi 24-28 Meniran terhadap Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil zona inhibisi pada fraksi 24-28 meniran menunjukkan bahwa kelima fraksi tersebut memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *S. aureus*. Sedangkan pada bakteri *E. coli* tidak terbentuk zona inhibisi yang menandakan tidak adanya aktivitas antibakteri. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa fraksi ini bekerja sebagai antibiotik yang berspektrum sempit sehingga hanya memberikan zona pada bakteri gram positif. Hasil tersebut kemungkinan dikarenakan perbedaan struktur bakteri. Bakteri *E.coli* memiliki tiga lapisan pembungkus sel yaitu outer membran yang tersusun oleh lipopolisakarida yang tebal, dinding sel, dan membran plasma dalam. Sifat molekul

lipopolisakarida ini non-polar. Sedangkan fraksi 24-28 merupakan fraksi polar. Sehingga aktivitas antibakteri pada *E.coli* lebih lemah dibandingkan dengan *S.aureus*^{17,18}.

Selain itu, karena fraksi yang didapat tidak dilakukan evaporasi, konsentrasi zat yang terkandung dalam fraksi kurang pekat dan diduga menjadi kurang berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*¹⁹.

Dari hasil pengujian kandungan senyawa aktif pada fraksi 24-28 dapat disimpulkan bahwa fraksi ini memiliki aktivitas antibakteri dari senyawa alkaloid, fenol, steroid, dan terpenoid. Alkaloid bekerja dengan mengganggu komponen peptidoglikan dinding sel sehingga dinding sel bakteri rusak²⁰. Mekanisme kerja fenol dalam perannya sebagai antibakteri yaitu dengan cara merusak membran sel dan dinding sel dan mempresipitasi protein dalam sel bakteri. Protein yang didenaturasi menyebabkan terjadi penurunan permeabilitas. Oleh karena itu, transportasi ion organik terganggu dan mengakibatkan pertumbuhan bakteri bisa terhambat/mati²¹.

Aktivitas steroid sebagai antibakteri yaitu karena sifatnya yang permeabel terhadap senyawa lipofilik, sehingga interaksinya terhadap membran fosfolipid dapat menurunkan integritas membran sehingga sel mengalami lisis dan rapuh²². Sedangkan peran terpenoid yaitu dengan cara mengganggu proses terbentuknya dinding dan membran sel sehingga organel tersebut terbentuk tidak sempurna. Oleh karena itu, pertumbuhan sel dapat dihambat²³.

Daya Hambat Kombinasi Fraksi 24-28 Meniran dan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Hasil pengujian statistik non-parametrik *Mann-Whitney Test* menyatakan bahwa kombinasi antibiotik dengan fraksi 25-28 pada *S. aureus* dan fraksi 24-28 pada *E. coli* didapatkan hasil yang tidak signifikan ($p > 0,05$) sehingga interaksinya dikategorikan *not distinguishable*. Hasil signifikan ($p < 0,05$) hanya didapatkan pada kombinasi amoksisilin dengan fraksi 24, namun setelah dilakukan penilaian dengan metode AZDAST fraksi ini juga memiliki interaksi *not distinguishable*. *Not distinguishable* atau tidak bisa dibedakan ini menandakan bahwa hasil kombinasi antara herbal dengan antibiotik sama dengan hasil pengujian secara tunggal.

Penelitian ini memiliki beberapa faktor bias yaitu ketebalan agar (volume media) pada cawan petri tidak sama dan penggunaan stok antibiotik di suhu ruang yang terlalu lama yang dapat mempengaruhi stabilitas antibiotik. Stabilitas antibiotik juga dapat dipengaruhi lingkungan luar seperti suhu, udara, cahaya, dan kelembapan²⁴.

Pada bakteri *S. aureus*, kombinasi fraksi 24 dengan amoksisilin menunjukkan hasil adanya zona hambat. Sedangkan hasil zona hambat pada ZOI tunggal fraksi 24 lebih dominan dalam memberikan

zona bening dibandingkan dengan antibiotik amoksisilin. Hal ini mengindikasikan bahwa pada kombinasi fraksi 24 dengan antibiotik amoksisilin, hanya fraksi 24 yang bekerja sebagai antibakteri. Pada fraksi 25 didapatkan zona pada uji tunggal antibiotik dan herbal, namun pada uji kombinasi didapatkan standar deviasi yang cukup tinggi ($> 10\%$). Fraksi 26, 27 dan 28 juga menunjukkan hasil *not distinguishable*, namun pada fraksi 26 didapatkan hasil ZOI tunggal antibiotik dengan standar deviasi yang terlampaui tinggi. Hasil kombinasi fraksi dengan antibiotik kloramfenikol pada bakteri *S. aureus* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri di kelima fraksi. Hasil tersebut menandakan bahwa baik fraksi maupun antibiotik memiliki zona inhibisi, namun tidak berinteraksi satu sama lain. Oleh sebab itu, kombinasi fraksi dengan antibiotik tidak diketahui mana yang lebih dominan.

Uji ZOI kombinasi fraksi dengan antibiotik amoksisilin pada bakteri *E. coli* menunjukkan tidak didapatkan hasil zona bening di sekitar sumuran sehingga tidak dilakukan perhitungan. Sedangkan kombinasi fraksi dengan antibiotik kloramfenikol didapatkan hasil *not distinguishable* di kelima fraksi. Hal ini terjadi karena zona yang terbentuk berasal dari aktivitas antibiotik kloramfenikol karena di pengujian tunggal kloramfenikol terbentuk zona.

Antibiotik amoksisilin bekerja dengan berikatan dengan enzim PBP (*Penicillin-binding protein*) dan menghambat sintesis peptidoglikan sehingga pertahanan morfologi bakteri terganggu. Amoksisilin lebih sulit menembus dinding sel karena struktur bakteri *E. coli* lebih kompleks. Oleh sebab itu, tingkat kerentanan bakteri *E. coli* terhadap amoksisilin lebih rendah dibanding pada *S. aureus*²⁵.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Fraksi polar F24-F28 dari ekstrak metanol meniran (*Phyllanthus niruri* L.) mengandung senyawa aktif alkaloid, fenol, steroid, terpenoid, dan derivatnya.
2. Fraksi polar F24-F28 dari ekstrak metanol meniran (*Phyllanthus niruri* L.) memiliki zona inhibisi atau aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus*.
3. Fraksi polar F24-F28 dari ekstrak metanol meniran (*Phyllanthus niruri* L.) tidak memiliki zona inhibisi atau aktivitas antibakteri pada bakteri *Escherichia coli*.
4. Kombinasi hasil fraksi polar F24-F28 dari ekstrak metanol meniran dengan antibiotik amoksisilin atau kloramfenikol memiliki interaksi *non distinguishable* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

SARAN

Adapun saran untuk meningkatkan dan mengembangkan penelitian ini lebih lanjut adalah:

1. Melakukan evaporasi pada fraksi sebelum melakukan pengujian aktivitas antibakteri.
2. Memperhatikan waktu penggunaan stok antibiotik agar stabilitasnya tetap terjaga.
3. Melakukan isolasi senyawa alkaloid, fenol, steroid, dan terpenoid sebelum dilakukan pengujian antibakteri, untuk mendapatkan antibiotik yang lebih poten.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada ikatan orangtua mahasiswa (IOM) yang telah mendanai penelitian ini, Laboratorium Herbal Biomedik dan Mikrobiologi FK UNISMA, serta kepada teman-teman yang telah memberikan dukungan kepada saya selama ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603–661. doi:10.1128/CMR.00134-14
2. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., dan Morse, S.A. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc.
3. Madappa T. 2011. Escherichia coli Infection. <http://emedicine.medscape.com/article/217485-overview#a0101>.
4. Ventola, C. Lee. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis, Part 1 Causes and Threats. *Journal of Pharmacy and Therapeutic.* 40(4): 277–283.
5. Ihsan, S; Kartina, dan N.I Akib. Studi Penggunaan Antibiotik Non Resep. *Media Farmasi Vol. 13 No. 2 September 2016* : 272-284
6. Leekha, Surbhi & Terrell, Christine & S Edson, Randall. (2011). General Principles of Antimicrobial Therapy. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic. 86. 156-67. 10.4065/mcp.2010.0639.
7. Riset Kesehatan Dasar. (2010). Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
8. Adelia, Ira, Rio R, Faisal. Efek Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*) dengan Antibiotik Amoxicillin, Chloramphenicol dan Co-trimoxazole terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Malang: UNISMA. 2018.
9. Harborne, J.B. Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Alih bahasa Kosasih Padmawinata. ITB Bandung. 1987; Hal 1-107.
10. Samuel G. Levine. Dip Reagents for Visualization in TLC. *Journal of Chemical Education.* 1996; 72(1), A4. Doi: 10.1021/ed073pA4
11. Davis & Stout. (1971). Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal Of Microbiology.* Vol 22 No 4.
12. Ziaei-Daroukalei N., Ameri M., Zhraei-Salehi et al. AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. USA: National Center for Biotechnology Information. 2016.
13. Akinjogunla OJ, Eghafona NO, Enabulele IO, Mbotto CI, Ogbemudia FO. Antibacterial activity of ethanolic extracts of *Phyllanthus amarus* against extended spectrum lactamase producing *Escherichia coli* isolated from stool samples of HIV sero-positive patients with or without diarrhoea. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2010;4:402–7.
14. Allardyce, C. S., Dyson, P. J., Ellis, D. J., Salter, P. A., Scopelliti, R. (2003) Synthesis and characterisation of some water soluble ruthenium (II)–arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. *J. Organomet. Chem.* 668: 35–42
15. Mensah, J. L., Lagarde, I., Ceschin, C., Michel, G., Gleye, J., Fouraste, I. (1990) Antibacterial activity of the leaves of *Phyllanthus discoideus*. *J. Ethnopharmacol.* 28: 129–133
16. Zubair, M.F. & Olubunmi, Atolani & Ibrahim, S.O. & Adebisi, O.O. & Hamid, Abdulmumeen & Sowunmi, R.A.. (2017). Chemical constituents and antimicrobial properties of *Phyllanthus amarus* (Schum & Thonn). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences.* 10. 238. 10.4314/bajopas.v10i1.35.
17. Coyle MB. 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology.
18. Romaniuk JAH and Cegelski L. 2015. Bacterial cell wall composition and the influence of antibiotics by cell-wall and whole-cell NMR. *Phylosophical Transactions B. National Center for Biotechnology Information.*
19. Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. 2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia: Jakarta.
20. Darsana, I. Besung, I. Mahatmi, H. Potensi Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara In Vitro. *Indonesia Medicus Veterinus.* 2012.
21. Damayanti, E. dan T. B. Suparjana. 2007. Efek penghambatan beberapa fraksi ekstrak buah mengkudu terhadap *Shigella dysenteriae*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman.
22. Ahmed, Bahar. 2007. Chemistry Of Natural Products. New Delhi: Departemen of Pharmaceutical Chemistry of Science. Jamia Hamdard.
23. Markham KR. Cara mengidentifikasi flavonoid. *Indonesia Medicus Veterinus.* 2012; 1(3): 337-51

24. Waney, et al. 2012. Pengaruh Suhu Terhadap Stabilitas Serta Penetapan Kadar Tablet Furosemida Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. Jurnal KESMAS. Vol.1(2):504-995
25. Gilman, A. G. 2012. Goodman & Gilman Dasar Farmakologi Terapi, Edisi 10, diterjemahkan oleh tim alih bahasa Sekolah Farmasi ITB, 1117, Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC.