

EFEK PENAMBAHAN FRAKSI SEMIPOLAR (F11-F17) *Imperata cylindrica* DENGAN AMOXICILLIN DAN CHLORAMPHENICOL TERHADAP DAYA HAMBAT PADA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

Mohammad Dio Ghafiqi, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

Email: mdioghaf@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Infeksi di Indonesia merupakan masalah utama di bidang kesehatan yang ditandai oleh angka prevalensi penyakit akibat infeksi yang semakin tinggi. Kombinasi herbal Alang-alang dengan antibiotik dapat menjadi alternatif terapi infeksi guna mencegah peningkatan angka resistensi antibiotik tunggal sehingga angka penyakit infeksi dapat ditekan. Penelitian ini bertujuan untuk menilai efek daya hambat kombinasi antibiotik amoxicillin atau chloramphenicol dengan fraksi semi polar (F11-17) terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Metode: Ekstrak metanolik alang-alang didapatkan dengan metode maserasi dilanjutkan proses fraksinasi menggunakan eluen atil asetat dan metanol. Pengujian *Zone of Inhibition* (ZOI) untuk melihat daya hambat melalui perhitungan diameter zona bening yang dinilai berdasarkan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergis Test* (AZDAST). Data dianalisa menggunakan uji parametrik *Dependent T Test* dilanjutkan uji *Mann-Whitney*. Analisa uji fitokimia menggunakan KLT yang disempnot dengan reagen dan diamati perubahan warna.

Hasil: Uji fitokimia F11-12 didapatkan alkaloid dan F14 didapatkan fenol. Kombinasi antibiotik *Chloramphenicol* dengan F13 menunjukkan jenis interaksi antagonis pada bakteri *E.coli* dengan nilai $13,3 \pm 1,5$ dan signifikansi $p=0,046$. Selain F13 didapatkan jenis interaksi not distinguishable pada antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Kesimpulan: F11-17 herbal tunggal tidak memiliki aktivitas antimikrobial. Pada F11-12 memiliki kandungan alkaloid dan F12-14 memiliki kandungan fenol. Pada F14 memiliki efek antagonis dengan kombinasi *Chloramphenicol* terhadap bakteri *E.coli*.

Kata Kunci: Uji Fitokimia, ZOI, Amoxicillin, Chloramphenicol, Alang-alang, Kombinasi Antibiotik Herbal

EFFECTS OF ADDITION OF SEMIPOLAR FRACTION (F11-F17) *Imperata cylindrica* WITH AMOXICILLIN AND CHLORAMPHENICOL ON INHIBITION GROWTH IN *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*

Mohammad Dio Ghafiqi, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Email: mdioghaf@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Infection in Indonesia is a major problem in the health sector which is characterized by an increasingly high prevalence of disease due to infection. The combination of Alang-alang herbs with antibiotics can be an alternative therapy for infection to prevent an increase in the rate of single antibiotic resistance so that the number of infectious diseases can be suppressed. This study aims to assess the inhibitory effect of the combination of the antibiotic amoxicillin or chloramphenicol with a semi-polar fraction (F11-17) on the bacteria *S.aureus* and *E.coli*.

Methods: *Imperata* methanolic extract was obtained by maceration method followed by the fractionation process using ethyl acetate and methanol eluent. *Zone of Inhibition* (ZOI) test to see the inhibition through the calculation of the diameter of the clear zone which is assessed based on the *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergic Test* (AZDAST) method. Data were analyzed using parametric test *Dependent T Test* followed by the *Mann-Whitney* test. Phytochemical test analysis using TLC sprayed with reagents and observed the color changes.

Results: Phytochemical test F11-12 obtained alkaloids and F12-14 obtained phenols. The combination of *Chloramphenicol* with F13 shows the type of antagonistic interaction in *E. coli* bacteria with a value of $13,3 \pm 1,5$ and the significance of $p = 0.046$. In addition to F13, there is a type of not distinguishable interaction on antibiotics against *S.aureus* and *E.coli*.

Conclusion: Single herbal F11-17 has no antimicrobial activity. In F11-12 has alkaloids and F14 has phenol content. In F13 its has an antagonistic effects with chloramphenicol in combination in *E.coli*

Keywords: Phytochemical test, ZOI, amoxicillin, chloramphenicol, Alang-alang, combinations of herbal antibiotic

PENDAHULUAN

Para peneliti mulai menggiatkan penemuan obat baru untuk menemukan produk alternatif pengganti akibat angka resistensi yang semakin meningkat. Hal ini mengacu pada obat yang lebih efektif, murah dengan efek samping yang kecil. Prevalensi penyakit infeksi di Indonesia menurut Riset Kesehatan Dasar 2017 diantaranya yaitu diare 12,3%, ISPA 4,4%, dan pneumonia 2%.¹ WHO mengeluarkan data bahwa setidaknya terdapat 2.049.442 kasus penyakit akibat resistensi antibiotik dan 23.000 diantaranya meninggal dunia.² Bakteri yang sudah mengalami resistensi adalah *S.aureus* dan *E.coli*. Bakteri *S.aureus* memiliki resistensi terhadap antibiotik golongan β -laktam khususnya derivat penisilin seperti metisilin dan golongan glikopeptida, seperti vankomisin.³ Bakteri *E.coli* memiliki resistensi terhadap antibiotik golongan β -laktam, fosfomisin, dan golongan kuinolon.⁴ Kombinasi antibiotik menggabungkan beberapa jenis antibiotik sebagai alternatif untuk mengatasi infeksi karena bakteri.⁵ Penggabungan ini didasarkan lokasi kerja, urutan, dan rute antibiotik yang berbeda.⁶

Alang-alang (*Imperata cylindrica*) di Indonesia menempati 4,4% total luas wilayah Indonesia.⁷ Berbagai manfaat alang-alang yang diterapkan dalam bidang medis yaitu sebagai anti inflamasi, neuroprotektif dan antidiuretik.⁸ Selain itu alang-alang menunjukkan interaksi senyawa dengan antibiotik. Penelitian sebelumnya telah meneliti daya hambat kombinasi antara herbal alang-alang dengan antibiotik. Perhitungan KHM interaksi kombinasi antara alang-alang dengan *chloramphenicol* dan *amoxicillin* terhadap *S.aureus* dan *E.coli* didapatkan interaksi aditif.⁹ Beberapa kandungan senyawa yang terkandung pada alang-alang adalah anemonin, saponin, tanin, polifenol, arundoin, fernenol, sillindrin, katekol, dan flavonoid.¹⁰

Pada penelitian ini menggunakan metode fraksinasi yang menggunakan pelarut semi polar. Pelarut semi polar seperti etil asetat, aseton dan kloroform telah digunakan dalam berbagai metode ekstraksi tanaman. Pelarut semi polar digunakan untuk mengesktrak senyawa herbal seperti flavonoid, tannin dan fenolik.¹¹ Pada fraksi 11-17 alang-alang diharapkan terdapat senyawa aktif yang mampu bekerja sebagai antibiotik. Senyawa ini dapat diisolasi dan digunakan sebagai terapi adjuvant dalam mengatasi infeksi *S.aureus* dan *E.coli*.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik *in vitro* yang menggunakan bakteri *S.aureus* dan *E.coli*. Penelitian ini berlangsung pada bulan Januari-April 2019 berlokasi di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium

Herbal Medik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Pembuatan Ekstrak Metanolik Alang-alang

Pembuatan ekstraksi alang-alang (*Imperata cylindrica*) dilakukan dengan metode maserasi simplisia. Simplisia ditimbang memakai neraca digital sebanyak 200 g dan diberikan metanol PA 96% sebanyak 2000 ml. Larutan simplisia dimasukkan ke 5 buah Erlenmeyer dengan pembagian yang rata. Erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 24 jam pada *shaker water bath*. Ekstrak disaring dan dievaporasi menggunakan *vacum buchner* dan *rotary vacum evaporator* bersuhu 55°C. Setelah volume filtrat berkurang dan hasilnya ditampung didalam gelas beaker 250 ml. Ekstrak tersebut akan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama 3 hari. Ekstrak didiamkan hingga menjadi lebih kental, lalu ditimbang beratnya.

Metode Fraksinasi Alang-alang

Pada tahapan proses ini ekstrak pekat metanol tanaman herbal alang-alang difraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Fasa diam yang digunakan resin silica gel dan fasa gerak menggunakan campuran pelarut etil asetat dengan rasio 9:1. Setiap fraksi 11-17 dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengkonfirmasi hasil dari kromatografi kolom secara kualitatif. Fraksi-fraksi yang memiliki senyawa yang sama dijadikan satu fraksi. KLT dilakukan menggunakan F254 Silica plate dengan eluent metanol-etil asetat dengan perbandingan 7:3.

Pembuatan Larutan Antibiotik

Antibiotik *chloramphenicol* dan *amoxicillin* masing-masing 1 g dilarutkan kedalam 10 ml aquadest secara terpisah. Konsentrasi akhir yang didapatkan yakni 1 mg/ml.

Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk pendeteksian tanaman yang diduga memiliki potensi sebagai obat herbal. Selain itu untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam suatu tanaman. Uji fitokimia pertama adalah menentukan kandungan alkaloid dengan menyempatkan larutan *Dragendorff* pada *spotting* KLT fraksi 11-17 ekstrak metanolik alang-alang. Perubahan warna dicatat dan diamati. Reagen *Dragendorff* umumnya menghasilkan rentang warna mulai dari kuning, oranye, merah, merah muda dan ungu dalam menentukan kandungan alkaloid.¹²

$$R_f = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak eluasi}}$$

Uji fitokimia selanjutnya adalah reagen ferri klorida (FeCl_3). Reagen disempatkan pada KLT lalu diamati perubahan warnanya dicatat. Reagen ini menghasilkan perubahan warna menjadi hijau, ungu,

biru atau hitam untuk mendeteksi kandungan fenol, steroid, dan terpen.¹³ Uji fitokimia selanjutnya adalah reagen formaldehid. Reagen disemprotkan pada KLT lalu diamati perubahan warna dicatat. Reagen ini menghasilkan perubahan warna menjadi warna coklat¹¹ untuk mendeteksi kandungan steroid, alkaloid, dan saponin.¹⁴

Zone of Inhibition (ZOI)

Uji ini dilakukan dengan menggunakan metode *pour plate*. Langkah pertama adalah mempersiapkan inokulum menggunakan spektrofotometer. Oshe steril digunakan untuk mengambil koloni bakteri pada media padat dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl 0,9% steril 10 ml. Warna yang berubah menjadi keruh, dilanjutkan dengan vortex untuk homogenisasi bakteri tersebut. Sampel bakteri diambil sebanyak 3 ml memakai mikropipet dan dimasukkan ke dalam kuvet. Hasil dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi dicatat dan dilakukan pengenceran menggunakan rumus dengan target OD600 nm sebagai berikut :

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

Setelah steril, suhu media diukur melalui termometer cahaya. Inokulum dimasukkan sebanyak 1% (10 ml/ 1 liter media) dari media bila suhu media kurang dari 50°C. Inokulum diaduk hingga tercampur secara merata. Media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20-25 ml, hingga terisi setengah ketinggian dari cawan (90 mm).

Pembuatan sumuran dilakukan menggunakan *cork borer*. Media dilubangi sebanyak 10 lubang pada uji tunggal antibiotik dan 5 lubang pada pengujian fraksi (F11-F17) pada tiap cawan petri. Pada tiap lubang dimasukkan sampel sebanyak 30 µl untuk ZOI tunggal antibiotik. Pada pengujian bersama diberikan 30 µl fraksi pada sumuran pertama. 15 µl fraksi pada sumuran kedua. 30 µl larutan antibiotik pada sumuran ketiga. 15 µl larutan antibiotik pada sumuran keempat. 15 µl fraksi dikombinasi dengan 15 µl larutan antibiotik pada sumuran kelima.

Hasil tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18- 24 jam dengan posisi cawan petri terbalik. Zona bening menandakan bahwa bahan coba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Zona tersebut diukur diameternya dengan penggaris dan dilaporkan dengan satuan mm. Tingkat kekuatan daya hambat bakteri menurut Davis dan Stout (1971), dikatakan lemah apabila diameter hambat yang diukur ≤ 5mm. Sedang apabila diameter hambat berukuran 5-10mm. Kuat apabila diameter hambat yang diukur 10-20mm dan sangat kuat apabila diameter hambat yang diukur >20mm.¹⁵

Hasil zona bening pada sumurandiinterpretasikan menggunakan metode

AZDAST. Hasil sinergis jika diameter zona bening pada kombinasi herbal dengan antibiotik (A+B) lebih besar daripada herbal tunggal (A) dan antibiotik tunggal (B), dan lebih kecil atau lebih besar dari kombinasi herbal (AA) dan atau kombinasi antibiotik (BB). Hasil antagonis jika didapatkan hasil A+B lebih kecil dari A ataupun B. Hasil aditif jika A+B sama dengan AA atau BB. Hasil potensial jika A atau B didapatkan sama dengan 0, A+B lebih besar dari A dan B, dan lebih kecil atau lebih besar dari AA dan atau BB.¹⁶

Analisa Data Statistik

Pembacaan hasil ZOI kombinasi dan tunggal dihitung menggunakan mistar dengan tingkat ketelitian 1 mm. Data dimasukkan ke aplikasi *Statistical Package for the Social Science (SPSS)* dimana data diolah untuk mendapatkan rata-rata dan standar deviasi. Uji statistik penelitian ini menggunakan uji parametrik *Dependent T Test* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara dua variabel. Variabel tersebut adalah *Zone of Inhibition (ZOI)* tunggal dan *Zone of Inhibition (ZOI)* kombinasi pada setiap fraksi aktif yang diujikan. Hasil *Zone of Inhibition (ZOI)* diinterpretasikan menggunakan metode AZDAST.

HASIL

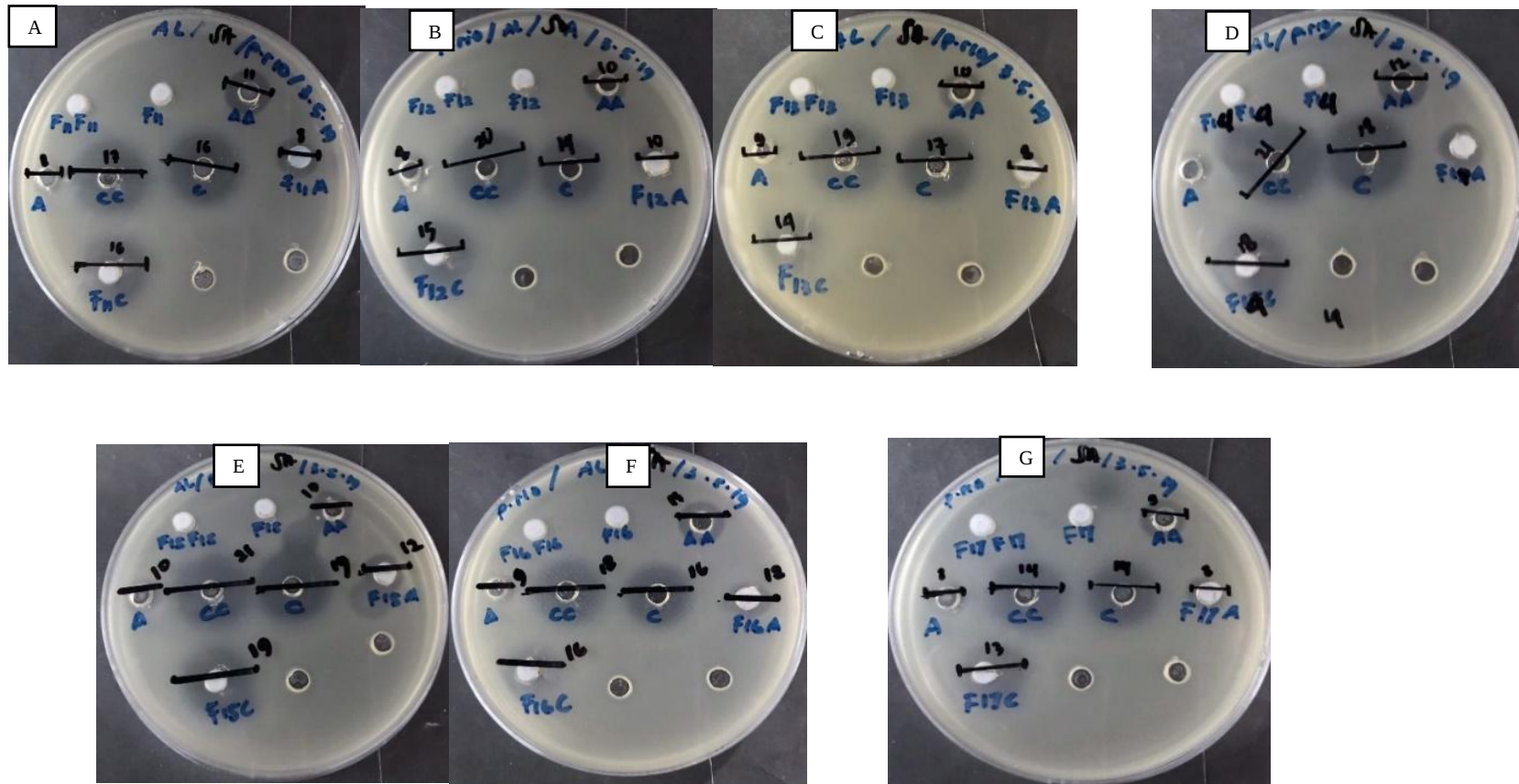
Hasil Uji Zone of Inhibition Antibiotik Tunggal Amoxicillin dan Chloramphenicol pada S.aureus dan E.coli

Zone of inhibition adalah uji yang dilakukan untuk kemampuan melihat aktivitas antimikroba suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini ditandai dengan adanya zona bening pada sumuran. Penghitungan diameter pada sumuran tersebut menggunakan penggaris millimeter.¹⁷ Penelitian yang dilakukan oleh Wardati tahun 2019 (*unpublished*) menggunakan pengukuran ZOI tunggal antibiotik sebagai indikator. Data ini memaparkan hasil uji ZOI kombinasi dimana didapatkan zona bening pada antibiotik *amoxicillin*. Dilusi ke-1 dengan konsentrasi 100 mg/ml didapatkan diameter 21,3±1,15 mm dan pada antibiotik *chloramphenicol* berdiameter 15,3±2,0 mm terhadap *S.aureus*.¹⁸ Hal ini menandakan bahwa *amoxicillin* memiliki ZOI lebih besar daripada *chloramphenicol* pada *S.aureus*. Sedangkan pada *E.coli*, antibiotik *amoxicillin* dengan konsentrasi 100 mg/ml diperoleh berdiameter 11,2±6,10 mm dan antibiotik *chloramphenicol* berdiameter 14±1 mm. Hal ini menandakan *chloramphenicol* memiliki ZOI lebih besar daripada *amoxicillin* pada *E.coli*.

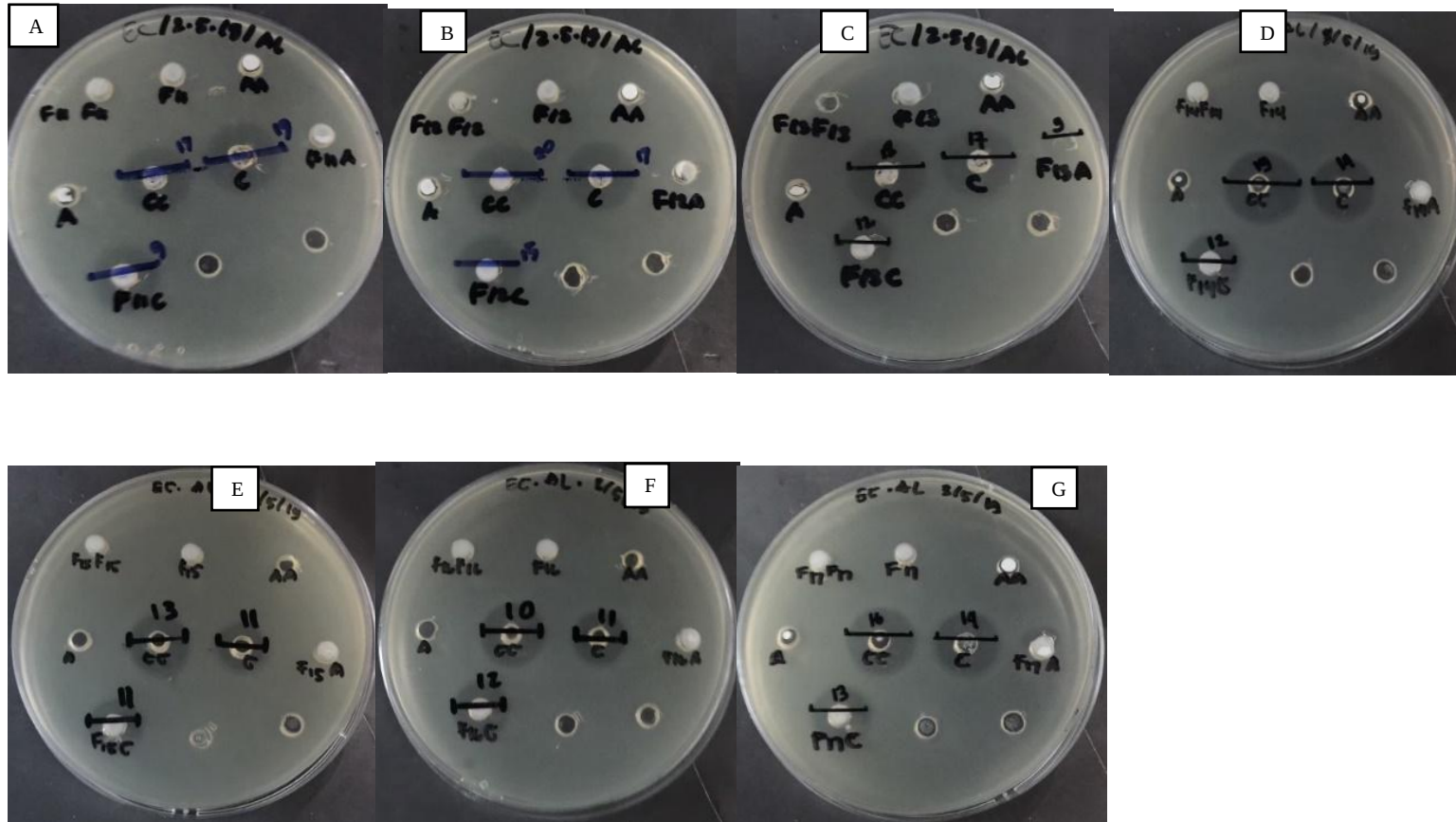
Hasil Uji Zone of Inhibition pada Alang-alang dan Chloramphenicol pada S.aureus dan E. coli

Pengamatan dan penghitungan uji zona bening pada Alang-alang dan *Chloramphenicol* terhadap

S.aureus dan *E.coli* dapat dilihat pada **Tabel 1.** dan **Gambar 1.** serta **Gambar 2.**



Gambar 1. Hasil Pengujian Bersama ZOI Fraksi Alang-alang dan Antibiotik pada *S.aureus*; **A.** Fraksi 11 ekstrak metanol Alang-alang, F11F11= Fraksi 11 dosis 30 μ l, F1= Fraksi 1 dosis 15 μ l, AA= Amoxicillin dosis 30 μ l, A= Amoxicillin dosis 15 μ l, CC= Chloramphenicol dosis 30 μ l, C= Chloramphenicol dosis 15 μ l, F1A= Kombinasi fraksi 1 dan Amoxicillin, F1C= Kombinasi fraksi 1 dan Chloramphenicol; **B.** Fraksi 12 ekstrak metanol Alang-alang; **C.** Fraksi 13 ekstrak metanol Alang-alang; **D.** Fraksi 14 ekstrak metanol Alang-alang **E.** Fraksi 15 ekstrak metanol Alang-alang; **F.** Fraksi 16 ekstrak metanol Alang-alang; **G.** Fraksi 17 ekstrak metanol Alang-alang



Gambar 2. Hasil Pengujian Bersama ZOI Fraksi Alang-alang dan Antibiotik pada *E.coli*; **A.** Fraksi 11 ekstrak metanol Alang-alang, F11F11= Fraksi 11 dosis 30 μ l, F1= Fraksi 1 dosis 15 μ l, AA= Amoxicillin dosis 30 μ l, A= Amoxicillin dosis 15 μ l, CC= Chloramphenicol dosis 30 μ l, C= Chloramphenicol dosis 15 μ l, F1A= Kombinasi fraksi 1 dan Amoxicillin, F1C= Kombinasi fraksi 1 dan Chloramphenicol; **B.** Fraksi 12 ekstrak metanol Alang-alang; **C.** Fraksi 13 ekstrak metanol Alang-alang; **D.** Fraksi 14 ekstrak metanol Alang-alang; **E.** Fraksi 15 ekstrak metanol Alang-alang; **F.** Fraksi 16 ekstrak metanol Alang-alang; **G.** Fraksi 17 ekstrak metanol Alang-alang

Tabel 1. Rerata Dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran *Zone of Inhibition* pada Pengujian Bersama Antara Fraksi Alang-alang dan *Chloramphenicol* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Sampel	<i>S.aureus</i>		<i>E.coli</i>	
	Rerata (mm) $\pm$ SD	Jenis Interaksi	Rerata (mm) $\pm$ SD	Jenis Interaksi
F11	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
C	14,3 $\pm$ 1,5		16,3 $\pm$ 4,6	
F11C	14,6 $\pm$ 1,5		11,6 $\pm$ 2,5	
F11F11	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
CC	16 $\pm$ 1,5		17,6 $\pm$ 2,0	
F12	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
C	15, $\pm$ 1,5		19 $\pm$ 2,6	
F12C	15,6 $\pm$ 0,5		14 $\pm$ 4,5	
F12F12	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
CC	19 $\pm$ 1		20,6 $\pm$ 2,0	
F13	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>	0 $\pm$ 0	antagonis
C	16,6 $\pm$ 1,5		16,3 $\pm$ 0,5	
F13C	15,6 $\pm$ 2,0		13,3 $\pm$ 1,5	
F13F13	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
CC	19,3 $\pm$ 0,5		17,6 $\pm$ 0,5	
F14	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
C	15 $\pm$ 4,3		14 $\pm$ 2	
F14C	17 $\pm$ 1,7		12,3 $\pm$ 0,5	
F14F14	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
CC	20,3 $\pm$ 1,5		17,6 $\pm$ 2,3	
F15	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
C	18 $\pm$ 2,6		12 $\pm$ 1,7	
F15C	17,6 $\pm$ 1,5		12,3 $\pm$ 2,3	
F15F15	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
CC	19,6 $\pm$ 1,1		14,6 $\pm$ 2,0	
F16	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
C	14,3 $\pm$ 1,5		12 $\pm$ 1	
F16C	15,3 $\pm$ 0,5		12 $\pm$ 0	
F16F16	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
CC	16,33 $\pm$ 1,52		13,6 $\pm$ 2,2	
F17	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
C	16,3 $\pm$ 2,5		13,6 $\pm$ 0,5	
F17C	14,3 $\pm$ 1,5		14,3 $\pm$ 1,5	
F17F17	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
CC	16,6 $\pm$ 3,7		16,6 $\pm$ 2,0	

Keterangan: FxFx= uji zoi tunggal fraksi Alang-alang dosis 30 μ l; Fx= uji zoi tunggal fraksi Alang-alang dosis 15 μ l; AA= uji zoi tunggal *Chloramphenicol* dosis 30 μ l; A= uji zoi tunggal *Chloramphenicol* dosis 15 μ l; FxA= uji zoi kombinasi fraksi Alang-alang dan *Chloramphenicol*. N.d :*Not distinguishable*

Berdasarkan **Tabel 1.** diatas, pada pengujian kombinasi antara herbal alang-alang dengan antibiotik *chloramphenicol* pada *S.aureus*, keseluruhan fraksi yakni fraksi 11-17 didapatkan hasil tidak signifikan ($p > 0,05$) setelah dilakukan uji statistik non-parametrik *Mann-Whitney Test*. Sedangkan pengujian terhadap *E.coli*, d keseluruhan fraksi didapatkan hasil tidak signifikan ($p > 0,05$) pada statistik non-parametrik *Mann-Whitney Test* terkecuali fraksi 13 dengan hasil antagonis.

Hasil *Zone of Inhibition* pada Alang-alang dan Amoxicillin pada *S.aureus*

Pengamatan dan penghitungan uji zona bening pada Alang-alang dan Amoksisilin terhadap *S.aureus* dapat dilihat pada **Tabel 2.** dan **Gambar 1.**

Tabel 2. Rerata Dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi pada Pengujian Bersama Antara Fraksi Alang-alang dan *amoxicillin* terhadap *S.aureus*

Sampel	Rerata (mm) $\pm$ SD	Jenis Interaksi
F11	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
A	4,6 $\pm$ 4,0	
F11A	7,3 $\pm$ 0,5	
F11F11	0 $\pm$ 0	
AA	8,6 $\pm$ 0,5	
F12	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
A	8,3 $\pm$ 0,5	
F12A	10,6 $\pm$ 6,1	
F12F12	0 $\pm$ 0	
AA	9,6 $\pm$ 0,5	
F13	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
A	8 $\pm$ 1	
F13A	5,6 $\pm$ 4,9	
F13F13	0 $\pm$ 0	
AA	9,3 $\pm$ 1,1	
F14	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
A	5,6 $\pm$ 4,9	
F14A	5 $\pm$ 4,3	
F14F14	0 $\pm$ 0	
AA	10,6 $\pm$ 1,1	
F15	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
A	9,6 $\pm$ 0,5	
F15A	10,3 $\pm$ 1,5	
F15F15	0 $\pm$ 0	
AA	11 $\pm$ 1,7	
F16	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
A	8,3 $\pm$ 0,5	
F16A	9,6 $\pm$ 2,0	
F16F16	0 $\pm$ 0	
AA	9 $\pm$ 2	
F17	0 $\pm$ 0	<i>not distinguishable</i>
A	10 $\pm$ 4,3	
F17A	8,3 $\pm$ 0,5	
F17F17	0 $\pm$ 0	
AA	9 $\pm$ 2	

Keterangan: FxFx= uji zoi tunggal fraksi Alang-alang dosis 30 μ l; Fx= uji zoi tunggal fraksi Alang-alang dosis 15 μ l; AA= uji zoi tunggal *Amoxicillin* dosis 30 μ l; A= uji zoi tunggal *Amoxicillin* dosis 15 μ l; FxA= uji zoi kombinasi fraksi Alang-alang dan *Amoxicillin*. N.d :*Not distinguishable*

Berdasarkan **Tabel 2** adapun hasil uji kombinasi antara herbal alang-alang dengan antibiotik *amoxicillin* pada keseluruhan didapatkan hasil tidak

signifikan ($p > 0,05$) setelah dilakukan uji statistik non-parametrik *Mann-Whitney Test*. Hal ini mengindikasikan bahwa jenis interaksi keseluruhan kombinasi antara herbal alang-alang dengan antibiotik baik *chloramphenicol* maupun *amoxicillin* adalah *not distinguishable*.

Hasil Uji Fitokimia

Uji *screening* fitokimia dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) *spray* pada fraksi 11-17 herbal alang-alang yang hasilnya ditunjukkan pada **Tabel 3**

Tabel 3. Hasil Perhitungan Rf pada KLT Spray

No. Fraksi	Alkaloid (Rf)	Fenol (Rf)	Steroid (Rf)
F11	+ (0,83)	-	-
F12	+ (0,83)	-	-
F13	-	-	-
F14	-	+ (0,86)	-
F15	-	-	-
F16	-	-	-
F17	-	-	-

Berdasarkan **Tabel 3.** diatas, didapatkan hasil dari uji KLT adanya alkaloid dan fenol. Pada senyawa alkaloid didapatkan fraksi 11 dan 12 memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,83. Sedangkan pada senyawa fenol didapatkan fraksi 12 dan 14 memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,86 serta fraksi 13 dengan nilai Rf 0,82.

PEMBAHASAN

Hasil Uji ZOI Tunggal pada Fraksi Alang-alang terhadap *S. Aureus* dan *E. coli*.

Hasil uji ZOI tunggal fraksi ekstrak metanolik alang-alang menunjukkan tidak adanya aktivitas antimikrobial pada *S.aureus* dan *E.coli* di keseluruhan fraksi. Hal ini dapat dilihat dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar sumuran. Adapun hal ini menunjukkan bahwa fraksi 11-17 tidak memiliki senyawa aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Anugraha tahun 2018 menyebutkan bahwa terdapat zona bening pada *S.aureus* dan *E.coli*, masing-masing berdiameter 11 mm pada *S.aureus* dan 10 mm pada *E.coli*. Hal ini menegaskan dugaan bahwa senyawa aktif pada penelitian sebelumnya tidak ditemukan pada fraksi 11-17. Berdasarkan uji skrining fitokimia, tanaman herbal alang-alang ditemukan kandungan senyawa alkaloid dan fenol. Namun kandungan kedua senyawa tersebut tidak memiliki aktivitas antimikrobial.

Hasil Uji ZOI Kombinasi Antibiotik dengan Fraksi Alang-alang terhadap *S. Aureus* dan *E. coli*.

Berdasarkan penelitian ini, hasil uji ZOI kombinasi antara fraksi semi polar ekstrak metanolik alang-alang dengan antibiotik *chloramphenicol* terhadap *E.coli* didapatkan fraksi 11 dan 12 terdapat kandungan senyawa alkaloid dan fraksi 14 yang mengandung senyawa fenol. Hasil didapatkan jenis interaksi *not distinguishable* pada keseluruhan fraksi terkecuali fraksi 13. Uji statistik *Mann-Whitney Test* pada fraksi 13 didapatkan hasil signifikan ($P < 0,05$) dengan jenis interaksi antagonis. Terdapat 3 mekanisme interaksi sinergis antara 2 senyawa yang mengandung efek antimikrobal yaitu melalui peningkatan permeabilitas dinding bakteri, interaksi secara langsung pada lokasi target dan adanya salah satu senyawa yang mempengaruhi senyawa lainnya.¹⁹ Interaksi antagonis diduga karena adanya *Proton-coupled Oligopeptide Transporter* (POT) YdgR sebagai jalan masuk *chloramphenicol* menuju sitoplasma *E.coli*. Transporter YdgR yang aktif dapat membantu menghambat pertumbuhan *E.coli* melalui meningkatkan kadar *chloramphenicol*.²⁰ Hal ini bertentangan dengan mekanisme kerja senyawa *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCg) pada kandungan fenol. EGCg bekerja melalui proses penurunan fungsi transporter *oligopeptide ABC transporter binding protein*.²¹ Dengan demikian, hal ini menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas daya hambat dari *chloramphenicol* dan senyawa EGCg.

Berdasarkan penelitian ini, hasil uji ZOI kombinasi antara fraksi 11-17 dengan *amoxicillin* terhadap *E.coli* didapatkan fraksi 11 dan 12 terdapat kandungan senyawa alkaloid dan fraksi 14 yang mengandung senyawa fenol. Kedua kandungan senyawa ini menghasilkan jenis interaksi *not distinguishable* pada keseluruhan fraksi. Tidak terdapatnya zona bening pada keseluruhan fraksi mengakibatkan tidak adanya data yang diperoleh untuk dilakukan uji statistik *Mann-Whitney Test*. Hal ini dikarenakan struktur dinding *E.coli* yang lebih kompleks sehingga antibiotik tersebut tidak mampu menembus komponen intraseluler.

Hasil uji ZOI kombinasi antara fraksi 11-17 dengan antibiotik *chloramphenicol* dan *amoxicillin* terhadap *S.aureus* dimana didapatkan fraksi 11 dan 12 terdapat kandungan senyawa alkaloid dan fraksi 14 yang mengandung senyawa fenol yang menghasilkan jenis interaksi *not distinguishable* pada keseluruhan fraksi. Hal ini didasarkan dari hasil yang tidak signifikan pada uji statistik *Mann-Whitney Test* ($P > 0,05$). Tampilan yang didapat pada *plate* berupa zona bening yang merupakan hasil murni dari aktivitas antibiotik *chloramphenicol*, dikarenakan fraksi 11 dan 12 tidak memiliki aktivitas antimikrobal.

Jenis interaksi *not distinguishable* diduga disebabkan beberapa faktor. Faktor seperti pemberian dosis antibiotik yang tidak tepat, konsentrasi pemberian fraksi yang tidak tepat, tidak terspesifikasinya isolat yang terkandung dalam suatu senyawa yang ditemukan didalam fraksi penelitian ini

Analisa Uji Screening Fitokimia

Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan, didapatkan hasil kandungan senyawa alkaloid dan fenol dimana kedua senyawa tersebut memiliki aktivitas antimikrobal. Pada penelitian sebelumnya, disebutkan bahwa alang-alang (*Imperata cylindrica*) memiliki kandungan senyawa alkaloid. Beberapa kelas golongan alkaloid adalah indol, piperidin, tomatidin, solenopsin, dan 1,3,4-oksidadiazol.²² Selain itu juga terdapat kandungan senyawa fenol.²³

Alkaloid memiliki beberapa kegunaan yang dimanfaatkan dalam bidang medis yakni sebagai agen antipiretik, analgetik, antihipertensi, antihipotensi, antiemetik dan antikolinergik.²⁴ Selain itu, alkaloid memiliki kemampuan sebagai antimikrobal berupa bakteristatik dan bakterisidal baik pada bakteri gram positif maupun gram negatif.²⁵ Alkaloid memiliki mekanisme kerja dengan merusak dinding membran luar dan membran sitoplasma sehingga terjadi kebocoran sel yang menyebabkan bakteri lisis.²⁶ Selain itu, alkaloid mampu menghambat enzim dioksigenase yang dapat mengganggu homeostasis bakteri.²⁷ Mekanisme lainnya melalui penghambatan enzim dihidrofolat reduktase yang akan menghambat terjadinya sintesis asam nukleat.²⁸

Fenol memiliki mekanisme kerja dengan menghambat enzim dehidrogenase dan oksidase.²⁹ Selain itu, fenol menyebabkan kerusakan membran sitoplasma sehingga terjadi pengeluaran komponen intraseluler bakteri.³⁰ Adapun kerusakan yang disebabkan fenol yaitu melalui perubahan permeabilitas membran.³¹

KESIMPULAN

Adapun kesimpulan untuk penelitian ini adalah:

1. Fraksi 11-17 semi polar ekstrak metanolik alang-alang (*Imperata cylindrica*) tidak mampu menghambat *S.aureus* dan *E. coli* secara tunggal.
2. Pada fraksi 11 dan 12 terdapat kandungan alkaloid, dan pada fraksi 4 terdapat kandungan fenol.
3. Kombinasi antara fraksi 13 semi polar ekstrak metanolik alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan antibiotik *chloramphenicol* menghasilkan jenis interaksi yang bersifat antagonis terhadap *E.coli*.

SARAN

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

1. Melakukan penelitian lebih lanjut berdasarkan hasil fraksinasi semi polar F11-17 dengan untuk mendapatkan isolat senyawa aktif yang spesifik pada turunan dari golongan senyawa aktif yang terkandung.
2. Menghimbau masyarakat dan tenaga medis untuk tidak menggunakan kombinasi herbal alang-alang dengan antibiotik *chloramphenicol* pada infeksi *E.coli* hingga diketahui bahan isolat yang mengandung efek antagonis.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dalam pendanaan penelitian dan dr. Rahma Triliana, M.Kes, Ph.D yang telah melakukan review pada jurnal penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta. 2008.
2. WHO. Antibiotic Resistance Threats in the United States. USA : US Department of Health and Human Services. USA : World Health Organization. 2013
3. Chang SMD, Dawn M, Sievert MS, Hageman JC, Matthew L, Boulton MD, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT et al.. Infection with vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **English Journal Medicine**. 348: 1342-1347. 2003.
4. Lindgren P K, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*; 47: 3222-32. 2003
5. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 2406. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI. Halaman 4-5, 62-64. 2011.
6. Levin S., Harris A. A. Principles of Combination Therapy. *Bull. N. Y. Acad. Med*. Vol. 51, No. 9. 1975
7. D. P. Garrity, M. Soekardi, M. van Noordwijk, R. de la Cruz, P. S. Pathak, H. P. M. Gunasena, N. van So, G. Huijun, N. M. Majid, The *Imperata* grasslands of tropical Asia: area, distribution, and typology, *Agroforestry Systems*, 36, 1, 3-29 10.1007/BF00142865. 1996
8. Hwee Ling Koh, Tung Kian Chua, Chay Hoon Tan, A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach, World Scientific, 2012.
9. Anugraha, D. Efek Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan Antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol dan Kotrimoksazol Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. 2018.
10. Tandi Herbie. Kitab Tanaman Berkhasiat Obat. Octopus Publishing House. Yogyakarta. 2015
11. Markham, K.R.. Cara Mengidentifikasi Flavonoid, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 19-21, 31, 41-47, 65-75, Penerbit ITB, Bandung. 1998.
12. Habib, A., False Positive Alkaloids Reactions. **J Pharm Sci**, 69, 37 – 40. 1980.
13. Harborne JB, *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall. London. 1984.
14. Jork, H., Funk, W., Fischer, W., & Wimmer, H., *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods*, 377, Basel, New York. Davis & Stout. *Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay*. **Journal Of Microbiology**. Vol 22 No 4. 1989.
15. Davis, W.W., and Stout, T.R., *Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay*. **Journal Of Microbiology**. Vol 22 No 4. 1971.
16. N. Ziaei-Daroukalei, et al., AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection, *MethodsX*. 2016.
17. Pierce-Hendry SA, Dennis J. Bacterial culture and antibiotic susceptibility testing. *Compendium*: E1-E5. 2010.
18. Wardati, F. Efek Daya Hambat Kombinasi Fraksi Semi Polar (F33-37) *Elephantopus scaber* dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Unpublished). 2019.
19. Bollenbach, T. 2015. Antimicrobial Interactions : mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 27: 1-9.
20. Prabhala, B.K., Aduri, .G., Sharma, N., Shaheen, A., Sharma, A., Iqbal, M., ... Mirza, O. The Prototypical proton-coupled oligopeptide transporter YdgR from *Escherichia coli* colifacilitates chloramphenicol uptake into bacterial cells. **Journal of Biological Chemistry**, 293(3), 1007-1017. 2017
21. Nakayama T., Kajiya K., Hojo H., Suzuki M., Nanjo F., Kumuzawa S. Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. *J. Agric. Food Chem*. 2004.
22. Yanti, Melda, Indriyanto, dan Duryat. Pengaruh Zat Alelopati dari Alang-alang Terhadap Pertumbuhan Semai Tiga Spesies Akasia. **Jurnal Sylva Lestari**. Vol. 4 No. 2. 2016.

23. Hanani, Endang. *Analisis Fitokimia*. Jakarta : Buku Kedokteran EGC. 2014.
24. Tyler VE, editors. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. London, UK: Williams and Wilkins; p. 144–85. 1996.
25. Alhanout K, Malesinki S, Vidal N, Peyrot V, Rolain JM, Brunel JM. New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine. **J Antimicrob Chemother**;65:1688–93. 2010.
26. Salmi C, Loncle C, Vidal N, Letourneux Y, Fantini J, Maresca M, et al. Squalamine: an appropriate strategy against the emergence of multidrug resistant Gram-negative bacteria *PLOS ONE* ;3:e2765. 2008.
27. Arai M, Yamano Y, Setiawan A, Kobayashi M. Identification of the target protein of agelasine D, a marine sponge diterpene alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. *Chembiochem* ;15:117–23. 2014.
28. Rao KN, Venkatachalam SR. Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine: the in vitro cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents. *Toxicol In Vitro* ;14:53–9. 2000.
29. Roberts. M. H .. and O. Rahn. The amount of enzyme inactivation at bacteriostatic and bactericidal concentrations of disinfectants. **J. Bacteria** **L** 52:639-644. 1946.
30. Vas, K. Mechanism of antimicrobial action. Interference with the cytoplasmic membrane. *Agrokemia es Talajtan* 2:1-16. !Chern. Abstr. 48:794d. 1954.
31. Juven, B., Y. Henis. and B. Jacoby. Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. **J. Appl. Bacterial.** 35:559-567. 1972.