

EFEK PENAMBAHAN FRAKSI SEMI-POLAR (F20-F26) EKSTRAK METANOLIK TAPAK LIMAN TERHADAP DAYA HAMBAT AMOKSISILIN ATAU KLORAMFENIKOL PADA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATAU *ESCHERICHIA COLI*.

Azura Fransisca Dwary*, Faisal**, Rio Risandiansyah **

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Tingginya permasalahan infeksi bakteri dapat diobati menggunakan antibiotik yang dapat meningkatkan risiko resistensi antibiotik. Kombinasi antibiotik dengan herbal *E.scaber* dapat meningkatkan efektivitas antibakteri dan mencegah terjadinya resistensi. Namun, penggunaan herbal *E.scaber* sebagai adjuvant memiliki efek yang berbeda-beda karena masih terdiri dari beberapa fraksi. Oleh sebab itu, perlu penelitian lebih lanjut tentang efek penambahan fraksi tapak liman pada antibiotik dalam membunuh bakteri *S.aureus* dan *E.coli*.

Metode: Uji Zona Inhibisi (ZOI) menggunakan metode Kirby-Bauer. Efek interaksinya dihitung berdasarkan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). Uji fitokimia menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan reagen $FeCl_3$, dragendorff, dan formaldehyde.

Hasil: Fraksi 23 memiliki interaksi sinergis dengan amoxicillin terhadap *S.aureus* dengan ZOI kombinasi $10,33 \pm 1,5$ mm amoxicillin tunggal, dan *E.scaber* tunggal terhadap *S.aureus* menghasilkan ZOI yang sama yaitu 0,0 mm. Fraksi 25 memiliki interaksi antagonis dengan chloramphenicol terhadap *S.aureus* dengan ZOI kombinasi 0,0 mm, ZOI antibiotik tunggal $25,67 \pm 2,0$ mm, ZOI herbal tunggal berturut-turut 0,0 mm. Ekstrak metanol *E.scaber* mengandung senyawa fenol, alkaloid, steroid, dan terpenoid.

Kesimpulan: Fraksi 23 *E. scaber* memiliki efek sinergis dengan amoxicillin terhadap *S.aureus* sehingga berpotensi sebagai adjuvan antibiotik terhadap *S.aureus*.

Kata Kunci: *Elephantopus scaber*, Amoxicillin, Chloramphenicol, Uji Fitokimia, ZOI, Kombinasi Antibiotik dan Herbal.

**Korresponen: riorisandiansyah@unisma.ac.id

Fakultas Kedokteran Universitas islam Malang

THE EFFECT OF SEMIPOLAR METHANOLIC FRACTION (F20-F26) *E. scaber* EXTRACT ON INHIBITORY EFFECT OF AMOXICILLIN AND CHLORAMPHENICOL AGAINST

Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli

Azura Fransisca Dwary*, Faisal**, Rio Risandiansyah**

*Students of the Faculty of Medicine of the Islamic University of Malang,

**Teaching Staff of the Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: The increasing bacterial infection that treat by using antibiotic can lead an antibiotic resistance. Herb combination such as *E.scaber* can increase the antibiotic effectivity and reduce the risk of antibiotic resistance. But, *E.scaber* as adjuvant has different interaction effect that caused by contains of many fraction. Therefore, further research need to study the effect of additional *E.scaber* extract fraction to antibiotic against *S.aureus* and *E.coli*.

Methods: Zone of inhibition test was used Kirby-Bauer method to determine antibacterial effect. It's interaction determined using *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). Phytochemical test interpreted by using Thin Layer Chromatography (TLC) fitokimian test by dragendorff reagent, $FeCl_3$, and formaldehyde .

Results: Synergistic effect showed by combination of amoxicillin and F23 against *S.aureus* with combination ZOI $10,33 \pm 1,5$ mm, single chloramphenicol 0,0 mm, and single *E.scaber* extract were 0,0 mm. Fraction 25 showed antagonistic effect with chloramphenicol against *S.aureus* with combination ZOI 0,0 mm, single chloramphenicol $25,67 \pm 2,0$ mm, and single *E.scaber* extract were 0,0 mm. Methanolic extract *E.scaber* contains phenol, alkaloid, steroid, and terpenoid.

Conclusion: *E.scaber* fraction 23 extract show synergistic interaction with amoxicillin against *S.aureus* and it potential to be an antibiotic adjuvant against *S.aureus*

Keywords: *Elephantopus scaber*., Amoxicillin, Chloramphenicol, Phytochemical Test, ZOI, Combination of Antibiotics and Herb.

**Corresponding author: riorisandiansyah@unisma.ac.id

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

PENDAHULUAN

Tingginya permasalahan infeksi bakteri dapat diobati menggunakan antibiotik yang salah satu khasiatnya memiliki efek membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri¹. Alternatif lain yang dapat dilakukan adalah kombinasi antibiotik dengan herbal sebagai upaya meningkatkan kerja antibiotik yang dapat menggantikan peran obat-obatan sintetis sebagai kombinasi tersebut. Senyawa aktif dari herbal jika dikombinasi dengan antibiotik mampu memberikan efek sinergis, antagonis atau aditif².

Kombinasi antara herbal dengan antibiotik diharapkan dapat meningkatkan kerja antibiotik dibandingkan apabila diberikan secara tunggal. Pada penelitian kombinasi teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan antibiotik amoksisilin yang mampu menghambat *Staphylococcus aureus* secara signifikan dengan cara merusak membran sel bakteri, menghambat sintesa asam lemak, dan menghambat aktivitas enzim pada bakteri³. Pada penelitian herbal sebelumnya, kombinasi tanaman herbal Alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan amoksisilin dan kloramfenikol bersifat sinergis terhadap bakteri *E. coli* dan bersifat aditif terhadap *S. aureus*. Hasil sinergis menandakan adanya interaksi antara herbal Alang-alang (*Imperata cylindrica*) yang mampu meningkatkan aktivitas dari antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil interaksi aditif menandakan bahwa tidak adanya interaksi antara herbal Alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*⁴.

Selain teh hijau dan alang-alang tanaman lain seperti tapak liman juga memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian kombinasi antara antibiotik dengan *Elephantopus scabr*, Linn telah dilakukan di Laboratorium Herbal Medik dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNISMA dengan menggunakan tapak liman dikombinasi dengan antibiotik kloramfenikol. Hasil dari penelitian tersebut yaitu kombinasi tapak liman dengan kloramfenikol terhadap *E.coli* bernilai aditif. Pengujian sebelumnya menggunakan ekstrak hasil dari tapak liman yang masih berupa *crude extract* yaitu alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid, steroid, tanin dan quinone akan interaksi dengan antibiotik yang memiliki aktifitas antibakteri⁵.

Penelitian ini akan melakukan fraksinasi dari ekstrak tapak liman setelah dilakukannya ekstraksi atau pemisahan dengan tujuan memisahkan senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya menjadi fraksi-fraksi. Secara khusus, penelitian akan menggunakan fraksi semi polar 20-26 dari pelarut methanol 50% dan etil asetat 50%. Hal ini didasarkan dari penelitian tentang aktivitas antimikroba pada fraksi etil asetat yang menemukan hasil dari fraksi dengan pelarut tersebut terdapat beberapa senyawa antimikroba seperti fenol, terpenoid, dan alkaloid yang merupakan golongan senyawa kimia dalam suatu herbal dengan aktivitas antimikroba. Sehingga, diharapkan hasil fraksinasi dengan pelarut tersebut mampu berinteraksi dengan

antibiotik. Penelitian ini juga melakukan uji fitokimia untuk mengetahui jenis kandungan senyawa aktifnya. Serta pengujian kombinasi antara fraksi tersebut dengan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol dengan menghitung perubahan *zone of inhibition* (ZOI) terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli*.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian menggunakan desain eksperimental laboratorium *in vitro* yang dilakukan untuk mengetahui efek dari ekstrak metanol *Elephantopus scabr* Linn yang dikombinasi dengan antibiotik amoksisilin atau kloramfenikol terhadap perubahan dari ZOI kombinasi dari *S.aureus* dan *E. coli*.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Januari hingga Mei 2019 di Mikrobiologi dan Laboratorium Herbal Medik Fakultas Kedokteran UNISMA.

Pembuatan Ekstrak Metanolik *E.scaber*.

Pembuatan ekstraksi Tapak Liman (*Elephantopus scabr* Linn) dilakukan dengan metode maserasi yang dimulai dengan mempersiapkan simplisia dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Setiap metode ekstraksi dibagi dalam rasio 1:10 pada simplisia yang telah ditimbang dan ditambahkan dengan pelarut⁶. Simplisia ditimbang dengan neraca digital sebanyak 200 g dan direndam dengan 2000 ml metanol 96% di dalam Erlenmeyer. Rendaman dibagi kedalam 5 Erlenmeyer berukuran 500 ml dengan setiap Erlenmeyer menggunakan 40 g simplisia dan 400 ml methanol 96%. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 1 hari dalam *shaker water bath*. Hasil ekstraksi difiltrasi dengan filter yang dibantu dengan vacuum. Filtrat yang dihasilkan kemudian dievaporasi dengan *Rotary vacuum evaporator* sampai terpisah dengan pelarutnya. Ekstrak yang telah ditimbang ditampung dalam gelas beker 250 ml dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama 3 hari.

Metode Fraksinasi *Elephantopus scaber* Linn

Ekstrak tapak liman difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam resin silica gel dan fasa gerak yaitu pelarut *ethyl acetate* dan methanol. Selain itu, ekstraksi ini juga menggunakan sistem *gradient solven*. Pada elusi gradien, polaritas sistem solven ditingkatkan secara perlahan dengan meningkatkan konsentrasi solven ke yang lebih polar⁷. Urutan susunan fraksi dari bawah ke atas yaitu kertas saring, *glass wool*, silika 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) 25 ml etil asetat : 25 ml metanol, 4) 25 ml etil asetat : 25 ml metanol, 5) 25 ml etil asetat : 25 ml

metanol, dan 6) 50 ml metanol. Hasil fraksi yang didapat ditampung di dalam vial yang berbeda untuk setiap warna yang berbeda.

Kromatografi Lapis Tipis

Uji Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan setelah didapatkan hasil fraksi untuk mengkonfirmasi hasil dari kromatografi kolom secara kualitatif, dimana fraksi-fraksi yang memiliki senyawa yang sama dijadikan satu fraksi. KLT dilakukan dengan menggunakan F254 Silica plate berukuran 5cm x 5cm dengan eluen metanol-ethyl acetate. Plat KLT yang telah diaktivasi dibubuhi dengan hasil fraksi menggunakan *yellow tip* sebanyak 50µL-100µL. Pembubuhan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar bubuhan. Kemudian setelah kering plat KLT dimasukkan dalam chamber berisi eluen dan didiamkan hingga pelarut naik sampai batas garis atas plat. Hasil fraksi di plat KLT yang diamati dibawah sinar UV, jika warna serupa dan penghitungan Rf sama, dianggap 1 hasil fraksi. Adapun rumus $Rf = (\text{jarak noda})/(\text{jarak eluasi})$ ⁷.

Pembuatan Larutan Antibiotik

Larutan antibiotik dibuat dengan mempersiapkan antibiotik yang digunakan yaitu amoxicillin atau chloramphenicol sebanyak 1000 mg, setelah itu dilarutkan dengan 100 ml aquadest steril secara terpisah sehingga didapatkan dosis 10mg/ml, kemudian lakukan pengenceran untuk antibiotik sampai 10 dilusi. Pengenceran yang dilakukan tiap dilusi yaitu dengan cara mengambil setengah volume dari dilusi sebelumnya dan diencerkan dengan aquadest steril volume yang sama pada tabung reaksi steril yang baru sampai pada dilusi ke-10. Antibiotik yang telah diencerkan dijadikan sebagai stok bahan penelitian⁸.

Uji Fitokimia

Pada uji fitokimia yang pertama kali dilakukan adalah menentukan kandungan alkaloid. KLT yang sudah ditotoli fraksi ekstrak metanolik tapak liman (F20-F26) disemprot dengan larutan dragendroff dan secepatnya diamati perubahan warnanya. Terbentuknya bercak berwarna coklat-jingga/orange-merah/coklat berlatar belakang kuning menandakan adanya kandungan alkaloid di dalamnya⁹.

Uji fitokimia selanjutnya yaitu menggunakan reagen FeCl₃ yang digunakan untuk mendeteksi adanya kandungan fenol, alkaloid, terpenoid. KLT yang sudah disemprot dipanaskan 10 menit, kemudian dapat diamati dan dicatat perubahan warnanya. Jika terjadi perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, biru dan hitam pekat menunjukkan adanya senyawa fenol¹⁰.

Reagen yang selanjutnya digunakan adalah *formaldehyde* yang dapat digunakan untuk mendeteksi kandungan steroid dan terpenoid. KLT yang telah disemprot dengan reagen tersebut didiamkan di suhu ruang sampai mengering.

Zone of Inhibition (ZOI)

Pengembangbiakan bakteri dilakukan menggunakan metode *Pour plate*. Isolat bakteri ditransfer dari media padat ke dalam tabung reaksi berisi NaCl 0,9% steril 10ml menggunakan oshe steril. Tabung reaksi dilakukan vorteks untuk homogenisasi bakteri. Sampel diambil menggunakan mikropipet sebanyak 3ml dan dimasukkan dalam kuvet. Kuvet dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi dilakukan pengenceran dengan target OD600nm adalah 0,2. Nilai dilakukan pengenceran sesuai dengan rumus berikut 0,2 :

$\text{Faktor dilusi} = \frac{\text{Abs. sampel}}{\text{Abs. target (0.2)}} \times \text{Volume sampel}$
--

Pengenceran dilakukan berdasarkan rumus di atas dengan NaCl 0,9% steril. Bakteri yang diencerkan hingga jumlahnya 10⁸ dan dilarutkan dalam media agar sebanyak 1% (10 ml/1 L media). Media dituang ke dalam cawan petri sehingga mengisi setengah ketinggian cawan (kira kira 20 - 25 ml pada cawan 90 mm)¹¹.

Media agar yang telah berisi bakteri dilubangi menggunakan *cork borer* sebanyak 10 lubang. Sampel yang diujikan dimasukkan sebanyak 30 - 50 µl menggunakan mikropipet dan ditunggu dalam LAF/ BSC selama 30 menit sampai 1 jam. Media selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Jika sampel yang diujikan tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri maka akan terbentuk sebuah zona bening (*clear zone*) disekeliling sumuran. Zona bening diukur dengan penggaris dengan satuan mm¹².

Analisa Statistik Data

Hasil ZOI dianalisa menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) untuk mendapatkan rerata dan standar deviasi. ZOI kombinasi diuji menggunakan Mann-Whitney Test untuk mengetahui perbandingan ZOI kombinasi dengan hasil ZOI tunggal.

Efek interaksi antara herbal dan antibiotik dievaluasi menggunakan metode AZDAST. Hasil dikatakan sinergis apabila diameter zona bening yang terbentuk pada kombinasi herbal dan antibiotik (AB) lebih besar dari herbal tunggal (A) dan antibiotik tunggal (B), dan lebih kecil atau lebih besar dari herbal kombinasi (AA) dan / atau antibiotik kombinasi (BB). Aditif jika AB sama dengan AA atau BB. Antagonis jika AB lebih kecil dari A atau B. Potensiasi jika salah satu dari A atau B sama dengan nol dan AB lebih besar dari A & B dan lebih kecil atau lebih besar dari AA dan / atau BB. Tidak bisa dibedakan (Not distinguishable) jika AB sama dengan salah satu dari A atau B¹².

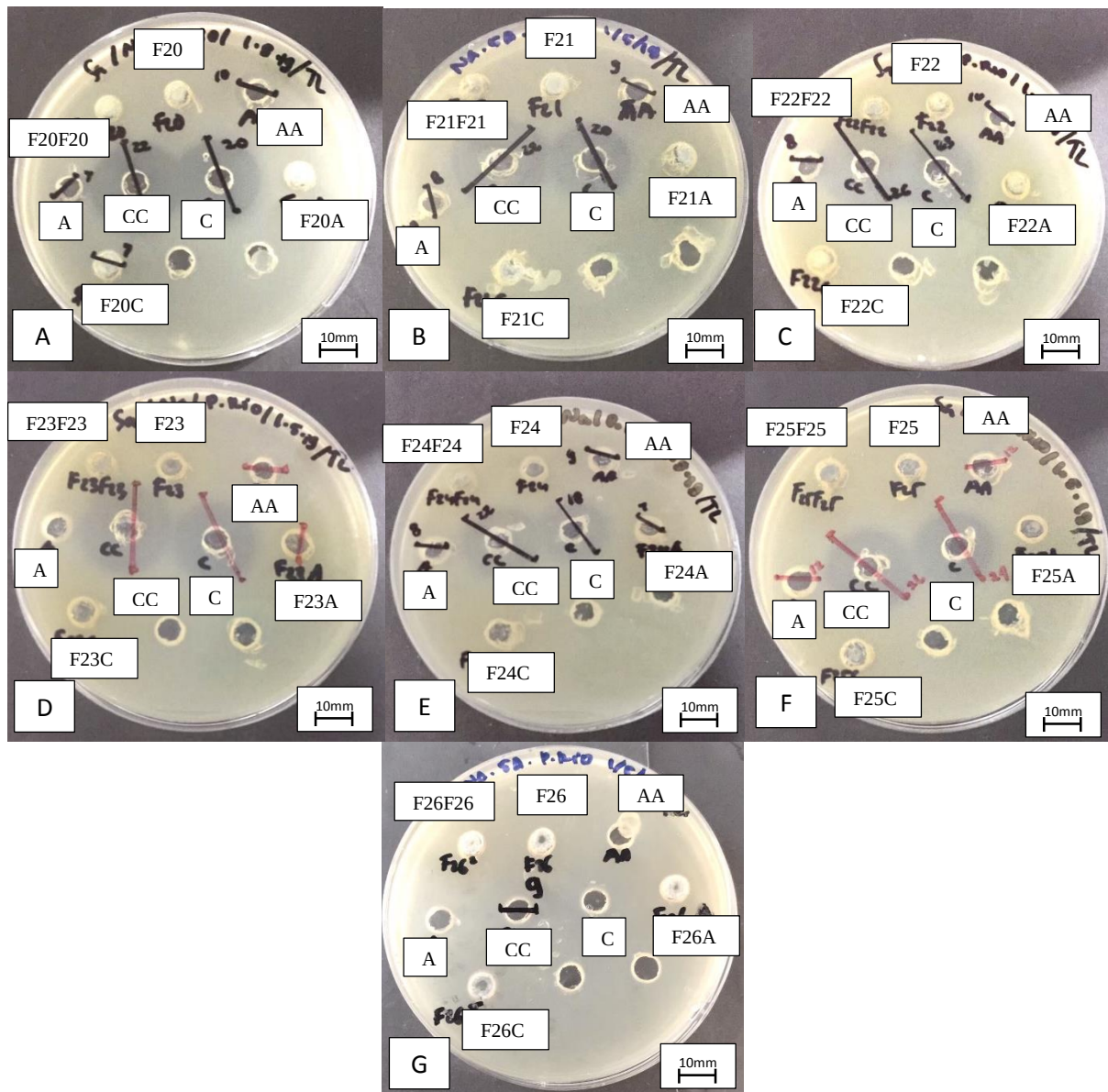
HASIL

Hasil Uji ZOI Kombinasi antara *E. scaber* Linn dengan Amoxicilin dan Chloramphenicol pada *S.aureus*

Uji ZOI kombinasi antara *E.scaber* dengan antibiotik Chloramphenicol atau Amoxicilin pada *S.aureus*. terlihat pada gambar 1.

Pada gambar 1A terlihat bahwa kombinasi fraksi 20 *E.scaber* dengan antibiotik Chloramphenicol menghasilkan *clear zone*. Pada gambar 1B terlihat fraksi 21 yang dikombinasikan dengan antibiotik chloramphenicol dan amoxicillin menghasilkan *clear zone*. Adanya *clear zone* menunjukkan bahwa kombinasi tersebut mengandung efek antibakteri.

Pada Tabel 1 menunjukkan uji kombinasi antara fraksi 23 *E.scaber* dan Amoxicillin terhadap *S.aureus* menghasilkan interaksi sinergis. Sedangkan, kombinasi fraksi 21,22,25 dengan amoxicillin terhadap *S.aureus* menghasilkan interaksi antagois. Kombinasinya dengan fraksi 20,24, dan 26 menghasilkan interaksi *not distinguishable*. Kombinasi fraksi 20-26 ekstrak *E.scaber* memiliki interaksi antagonis dengan Chloramphenicol dalam membunuh *S.aureus*



Gambar 1. Hasil uji ZOI kombinasi *E.scaber* dengan antibiotik Chloramphenicol atau Amoxicilin terhadap *S. aureus*.

Keterangan. A. Fraksi 20 ekstrak metanolik *E.scaber*, F20F20= Fraksi 20 dosis 30 μ l, F20= Fraksi 20dosis 15 μ l, AA= Amoxicilin dosis 30 μ l, A= Amoxicilin dosis 15 μ l, CC= Chloramphenicol dosis 30 μ l, C= Chloramphenicol dosis 15 μ l, F20A= Kombinasi fraksi 20 dan Amoxicilin, F20C= Kombinasi fraksi 20 dan Chloramphenicol; B. Fraksi 21 ekstrak metanolik *E.scaber*; C. Fraksi 22 ekstrak metanolik *E.scaber*; D. Fraksi 23 ekstrak metanolik *E.scaber*; E. Fraksi 24 ekstrak metanolik *E.scaber*; F. Fraksi 25 ekstrak metanolik *E.scaber*. G. Fraksi 26 ekstrak metanolik *E.scaber*.

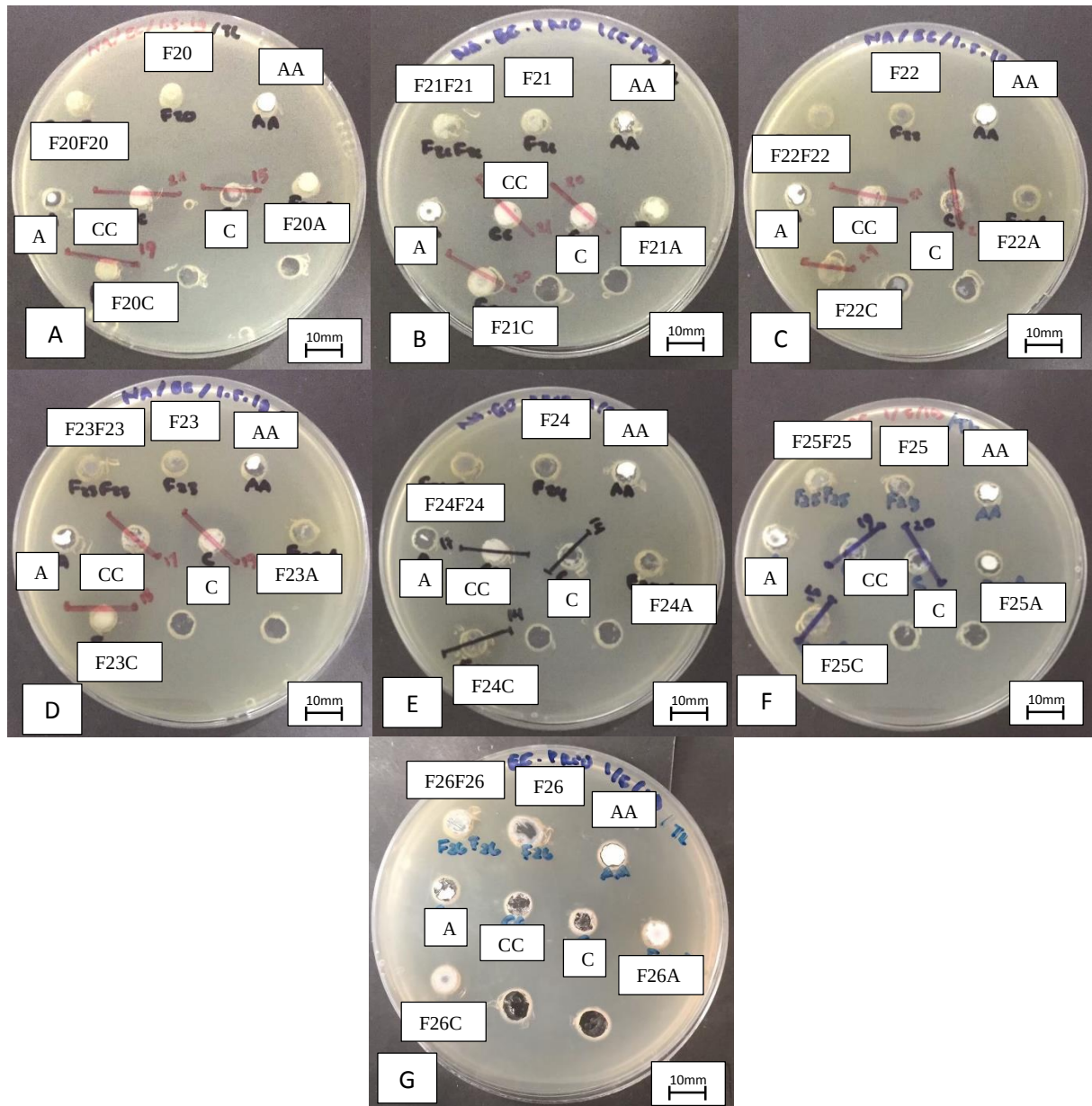
Hasil Uji ZOI Kombinasi antara *E.scaber* Linn dengan Amoxicilin dan Chloramphenicol pada *E.coli*

Uji ZOI kombinasi antara fraksi-fraksi ekstrak metanol *E.scaber* dengan antibiotik Chloramphenicol dan Amoxicilin pada *E.coli*. terlihat pada gambar 2 dan tabel 1.

Berdasarkan gambar 2 terlihat tidak terdapat gambran *clear zone* ketika fraksi *E.scaber* dikombinasikan dengan Amoxicillin. Pada gambar 2B terlihat bahwa terdapat *clear zone* yang terbentuk dari kombinasi F21 dengan chloramphenicol.

Adanya *clearzone* pada media agar menunjukkan bahwa fraksi kombinasi ataupun tunggalnya memiliki efek antibakteri terhadap *E.coli*

Pada Tabel 3 tersebut menunjukkan uji kombinasi antara fraksi *E.scaber* dan Chloramphenicol dan Amoxicillin terhadap *E.coli*. Kombinasi fraksi 20-26 *E.scaber* dengan Chloramphenicol ataupun Amoxicillin menghasilkan interaksi *not distinguishable* dimana hasil rerata kombinasi sama dengan salah satu antibiotik atau fraksi dalam membunuh *E.coli*.



Gambar 2. Hasil uji ZOI kombinasi *E.scaber* dengan antibiotik Chloramphenicol atau Amoxicilin terhadap *E.coli*.

Keterangan A. Fraksi 20 ekstrak metanolik *E.scaber*, F20F20= Fraksi 20 dosis 30 μ l, F20= Fraksi 20dosis 15 μ l, AA= Amoxicilin dosis 30 μ l, A= Amoxicilin dosis 15 μ l, CC= Chloramphenicol dosis 30 μ l, C= Chloramphenicol dosis 15 μ l, F20A= Kombinasi fraksi 20 dan Amoxicilin, F20C= Kombinasi fraksi 20 dan Chloramphenicol; B. Fraksi 21 ekstrak metanolik *E.scaber*; C. Fraksi 22 ekstrak metanolik *E.scaber*; D. Fraksi 23 ekstrak metanolik *E.scaber*; E. Fraksi 24 ekstrak metanolik *E.scaber*; F. Fraksi 25 ekstrak metanolik *E.scaber*. G. Fraksi 26 ekstrak metanolik *E.scaber*.

Tabel 1. Rerata dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi pada Pengujian Bersama antara Kombinasi Fraksi *E.scaber* dengan Amoxicilin dan Chloramphenicol terhadap Bakteri *S. aureus* dan *E.coli*

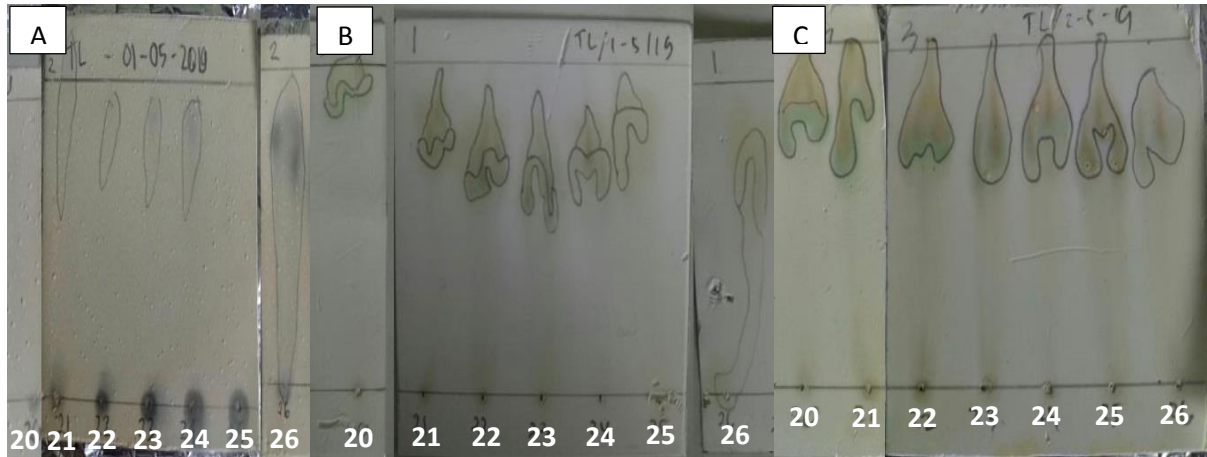
No. Fraksi	Sampel	<i>S.aureus</i>				<i>E.coli</i>			
		AMX	JI	CHL	JI	AMX	JI	CHL	JI
		Rerata± SD (mm)		Rerata± SD (mm)		Rerata± SD (mm)		Rerata± SD (mm)	
20	F20F20	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ND
	F20	0,0±0,0 ^{a,b}		0,0±0,0 ^{a,b}		0,0±0,0		0,0±0,0 ^{a,b}	
	AA	9,33±1,1		21,67±0,5		0,0±0,0		20,67±1,1	
	A	6,33±0,5		18,67±1,1		0,0±0,0		17,67±2,5	
	F20A	2,67±4,6		7,67±0,5 ^a		0,0±0,0		20,33±1,5	
21	F21F21	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ND
	F21	0,0±0,0 ^a		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		0,0±0,0 ^{a,b}	
	AA	9,33±0,5		22,67±1,1		0,0±0,0		20,00±1,7	
	A	8,0±1,0		20,67±1,1		0,0±0,0		21,33±3,2	
	F21A	0,0±0,0 ^a		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		19,67±0,5	
22	F22F22	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ND
	F22	0,0±0,0 ^a		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		0,0±0,0 ^{a,b}	
	AA	10,0±0,0		23,33±2,3		0,0±0,0		17,33±4,0	
	A	7,67±0,5		20,33±2,5		0,0±0,0		17,67±4,5	
	F22A	0,0±0,0 ^a		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		18,33±2,3	
23	F23F23	0,0±0,0	SNG	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ND
	F23	0,0±0,0 ^b		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		0,0±0,0 ^{a,b}	
	AA	10,67±1,5		23,33±0,5		0,0±0,0		17,33±1,5	
	A	0,0±0,0 ^b		22,67±1,1		0,0±0,0		18,66±1,5	
	F23A	10,33±1,5 ^a		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		17,33±2,0	
24	F24F24	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ND
	F24	0,0±0,0 ^{a,b}		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		0,0±0,0 ^{a,b}	
	AA	10,33±1,5		22±0,0		0,0±0,0		16,67±0,5	
	A	7,33±0,5		19,33±1,1		0,0±0,0		14,67±0,5	
	F24A	5,33±4,7		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		14,33±0,5	
25	F25F25	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ND
	F25	0,0±0,0 ^a		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		0,0±0,0 ^{a,b}	
	AA	13, 67±2,0		26,67±2,0		0,0±0,0		18,0±1,0	
	A	12,0±1,0		25,67±2,0		0,0±0,0		17,33±3,7	
	F25A	0,0±0,0 ^a		0,0±0,0 ^a		0,0±0,0		15,0±1,0	
26	F26F26	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ANT	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ND
	F26	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	AA	0,0±0,0		3,0±5,1		0,0±0,0		0,0±0,0	
	A	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	F26A	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	

Keterangan: JI= Jenis interaksi; FxFx= uji ZOI tunggal fraksi *E.scaber* dosis 30µl; Fx= uji ZOI tunggal fraksi *E.scaber* dosis 15µl; AA= uji ZOI tunggal Antibiotik dosis 30µl; A= uji ZOI tunggal Antibiotik dosis 15µl; FxA= uji ZOI kombinasi fraksi *E.scaber* dan Antibiotik; ND, *Not Distinguishable*; ANT, Antagonis; SNG, Sinergis; a, berbeda signifikan dengan antibiotik dosis 15 µl; b, berbeda signifikan dengan kombinasi fraksi dan antibiotik, p<0,05

Hasil Uji Fitokimia Fraksi 20-26 Ekstrak Metanolik *E.scaber*

Hasil dan analisa *screening* fitokimia metanolik *E.scaber* menggunakan metode KLT pada fraksi 20-26 dengan menyemprotkan reagen *dragendorff*, $FeCl_3$, dan *formaldehyde* pada plat KLT seperti yang

terlihat pada gambar 3. Keterangan kandungan senyawa kimia pada fraksi 20-26 tercantum pada tabel 2 yang ditandai dengan adanya perubahan warna setelah disemprotkan dengan masing-masing reagen.



Gambar 3. hasil KLT Spray pada Fraksi 20-26 Ekstrak Metanolik *E.scaber* yang telah disemprotkan reagen; A. $FeCl_3$; B. *formaldehyde*; C. *dragendorff*.

Tabel 2 Hasil Perhitungan *Rf* pada KLT F20-F26

No.Fraksi	Reagent (Senyawa Aktif)		
	Dragendorff Alkaloid	$FeCl_3$ Fenol	Formalehyde Steroid dan Terpenoid
F20	+	-	+
F21	+	+	+
F22	+	+	+
F23	+	+	+
F24	+	+	+
F25	+	-	+
F26	+	+	+

Keterangan Hasil penyemprotan dengan *Dragendorff* (+) = berwarna jingga/orange atau hijau; $FeCl_3$ (+) = berwarna ungu, biru dan hitam pekat; *Formaldehyd* (+) = cokelat; (-) = tidak terjadi perubahan warna.

Pada tabel 2 menunjukkan hasil terdapat kandungan senyawa fenol pada fraksi 21,22,23,24,dan 26 dengan nilai Rf berturut-turut adalah 0,53;0,63;0,57;0,57; dan 0,65. Kandungan senyawa alkaloid terdapat pada fraksi 20-26 dengan nilai Rf berturut-turut 0,86;0,86; 0,67;0,57;0,59;0,62; dan 0,56. Kandungan steroid dan terpenoid terdapat pada ekstrak *E.scaber* fraksi 20-26 dengan nilai Rf masing-masing 0,91; 0,75; 0,70; 0,64; 0,75; 0,86; dan 0,57. Kandungan fenol, alkaloid, dan terpenoid yang dominan memiliki Rf masing-masing 0,57; 0,86; dan 0,75. Nilai *Retention factor* (Rf) pada plat KLT dapat digunakan dalam mengidentifikasi distribusi dan pergerakan suatu senyawa terhadap pelarut. Jika nilai Rf memiliki nilai yang sama, maka senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Semakin kecil nilai Rf dan semakin pelan senyawa tersebut bergerak naik, maka kepolaran senyawa semakin bertambah.

PEMBAHASAN

Efek Penambahan Fraksi (F20-F26) Ekstrak Tapak Liman pada Amoksisilin atau Kloramphenkol terhadap ZOI *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli*.

Pada penelitian ini, metode uji zona hambat menggunakan difusi sumuran dan hasilnya didapatkan dengan mengukur diameter *clear zone*¹³. Pada penelitian ini antibiotik yang digunakan adalah Amoxicillin dan Chloramphenicol karena sering digunakan di masyarakat dan klinis.

Interaksi antara Amoxicillin dan Fraksi 21,22, dan 25 bersifat antagonis terhadap *S.aureus*. Hasil interaksi yang sama juga ditemukan ketika Fraksi 20-26 dikombinasikan dengan chloramphenicol dalam membunuh *S.aureus*.

Penelitian lain menyebutkan bahwa efek antagonis dapat disebabkan oleh mekanisme *reactive oxygen species* (ROS) dan antioksidan yang terkandung dalam antibiotik dan herbal¹¹. Antibiotik chloramphenicol dapat menstimulasi hiperaktivasi transport elektron dalam sel sehingga membentuk ion super radikal. Ion radikal tersebut merusak DNA, lipid, dan protein bakteri sehingga terjadi kematian bakteri. Hal yang sebaliknya, terjadi pada saat herbal diberikan pada bakteri. Herbal memiliki senyawa antioksidan yang dapat menghambat ROS yang distimulasi oleh antibiotik. Terdapat tiga jenis antibiotik antibakterisidal seperti quinolon, aminoglikosida, dan beta-laktam dapat menstimulasi ROS¹⁴.

Efek antagonis antara dua jenis antibakteri juga dapat disebabkan oleh perbedaan mekanisme dalam membunuh bakteri. Penelitian sebelumnya, antibiotik interaksi antagonis bisa terjadi jika terdapat antibiotik sifat bakterisidal dan bakteristatik¹⁵.

Amoxicillin berkerja dengan cara inhibisi reseptor PBP pada dinding sel bakteri sehingga terjadi inhibisi sintesis peptidoglikan dan bakteri mengalami lisis. Chloramphenicol bekerja dengan

cara berikatan dengan protein ribosom 50S sehingga menghambat proses *peptidyl transferase*¹⁴. Proses tersebut berfungsi dalam sintesis protein. Hambatan pada proses ini menyebabkan penurunan protein-protein yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Selain perbedaan mekanisme kerja antibiotik, struktur bakteri juga mempengaruhi kerja antibiotik dalam membunuh bakteri¹⁶.

Kombinasi fraksi 23 dengan amoxicillin bersifat sinergis dalam membunuh *S.aureus*, hal ini diduga karena fraksi 23 mengandung alkaloid, fenol, steroid dan turunannya terpenoid yang diketahui bekerja secara intrasel. Kombinasi antibakteri yang bekerja secara intrasel diketahui dapat berinteraksi sinergis dengan antibiotik yang bekerja pada dinding sel¹⁷.

Mekanisme amoxicillin dalam membunuh bakteri diawali dengan berikatan dengan penicillin binding protein (PBP). Ikatan tersebut akan menyebabkan gangguan sintesis peptidoglikan dan menghambat sintesis dinding sel bakteri. Mekanisme sinergis dari kombinasi amoxicillin dengan antibiotik terjadi dengan cara amoxicillin menghambat sintesis dinding sel sehingga antibiotik lain lebih mudah dalam menembus dinding sel¹³.

Pada uji zoi amoxicillin terhadap *E.coli* tidak didapatkan hasil mekanisme bakteristatik dan bakterisidal. Hal ini dapat disebabkan karena kesalahan pada proses penyimpanan antibiotik amoxicillin. Suhu penyimpanan mempengaruhi tingkat degradasi zat aktif, kelembapan, dan Ph dapat mempengaruhi degradasi kadar amoxicillin¹⁸. Selain itu, kerja amoxicillin juga dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Stabilitas amoxicillin mengalami penurunan lebih tinggi 50% pada suhu kamar (27°C -29°C). Sedangkan, pada suhu kulkas (4°C - 8°C) tingkat degradasi kadar amoxicillin lebih rendah yaitu sebesar 10%^{19,20}.

Penelitian ekstrak metanol daun Tapak liman terbukti memiliki efek antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri tersebut antara lain *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Proteus vulgaris*²¹. Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa terpenoid ekstrak aseton tapak liman juga dapat membunuh *S.aures*²⁸. Penelitian oleh Anita, dkk tahun 2012 menunjukkan bahwa ekstrak aseton, chloroform, dan etanol dari herbal tersebut dapat membunuh *S.aureus* sedangkan ekstrak benzenanya dapat membunuh *E.coli*²³.

Kombinasi Amoxicillin menghasilkan efek sinergis jika dikombinasikan dengan herbal. Kombinasi Amoxicillin dengan herbal *Mallotus oppositifolius*, *Bidens pilosa*, *Morinda lucida*, *Croton membranaceus* dan *Jatropha curcas* menghasilkan efek sinergis dalam membunuh *S.aureus*²⁴. Selain itu, kombinasinya dengan ekstrak *Spathodia campanulata*, *M.lucida*, *M. oleifera* dan *J. curcas* bersifat sinergis dalam membunuh *E.coli*²⁵. Sedangkan, Chloramphenicol juga diketahui memiliki interaksi sinergis ketika dikombinasikan dengan ekstrak metanol *Acacia mearnsii*²⁵ dan

ekstrak etil asetat *Melissa officinalis* dalam membunuh *E.coli* dan *S.aureus*²⁶.

Analisa Uji Fitokimia

Hasil dari uji screening fitokimia yang dilakukan pada F20-F26 menunjukkan adanya senyawa aktif fenol, alkaloid, terpenoid, steroid dan terpenoid (tabel 2). Pada uji screening fitokimia yang menggunakan reagen FeCl₃ didapatkan hasil positif (+) jika didapatkan perubahan warna menjadi warna orange menandakan adanya kandungan alkaloid di dalamnya³³. Pada penelitian ini kandungan fenol tampak pada fraksi 21,22,23,24, dan 26.

Pengujian dengan reagen *Dragendorff*, digunakan untuk identifikasi kandungan alkaloid. Pada penelitian ini terdapat 2 jenis hasil identifikasi adanya senyawa alkaloid yaitu orange dan hijau²⁷. Pada identifikasi alkaloid dengan hasil warna orange terdapat pada fraksi 20-26 sedangkan dengan warna hijau terdapat pada fraksi 20-24.

Uji fitokimia reagen *Dragendorff*, digunakan untuk identifikasi kandungan steroid dan terpenoid³³. Pada penelitian ini fraksi yang mengandung senyawa terpenoid adalah F20-F26.

Pada penelitian ini terdapat 2 jenis hasil identifikasi adanya senyawa alkaloid yaitu orange dan hijau³³. Pada identifikasi alkaloid dengan hasil warna orange terdapat pada fraksi 20-26 sedangkan dengan warna hijau terdapat pada fraksi 20-24.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Jamal bahwa ekstrak metanol *E.scaber* mengandung fenol. Namun, pada penelitian tersebut tidak menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari *E.scaber* mengandung senyawa terpenoid, alkaloid, dan steroid²⁸. Perbedaan kandungan senyawa antara kedua hasil ini diduga disebabkan oleh perbedaan lokasi herbal. Perbedaan lokasi menyebabkan perbedaan kandungan nutrisi tumbuhan sehingga terjadi perbedaan senyawa aktif.

Pada uji fitokimia KLT terdapat spot mengalami tailing sehingga dapat menyebabkan kesulitan dalam proses identifikasi. Salah satu penyebabnya adalah kurang tepatnya pemilihan fasa gerak sehingga chamber menjadi kurang jenuh. Selain itu, dosis fraksi yang ditotolkan terlalu pekat sehingga menyebabkan tailing, dan juga panjang jarak elusi yang kurang akurat atau terlalu pendek sehingga proses elusi kurang sempurna²⁷.

KESIMPULAN

Efek sinergis ditemukan pada kombinasi amoxicillin dengan F23 terhadap *S.aureus*. Efek antagonis ditemukan pada kombinasi chloramphenicol dengan F20-F26 terhadap *S.aureus*. Fraksi F20-F26 mengandung fenol, alkaloid, steroid, dan terpenoid.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang mekanisme antibakteri fraksi *E.scaber* dalam membunuh *S.aureus* dan *E.coli*.

SARAN

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

1. Melakukan penelitian lanjutan uji *Zone of Inhibition* (ZOI) pada fraksi polar (F20-26) Ekstrak Metanolik *E. scaber*, L. menggunakan konsentrasi yang lebih besar untuk mempengaruhi daya hambat pada kombinasi *E. scaber*, L. dengan antibiotik *Amoxicillin*, dan *Chloramphenicol* terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.
2. Melakukan penelitian lanjutan dari penelitian ini menggunakan antibiotik murni pada *Amoxicillin* atau *Chloramphenicol*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada ikatan orangtua mahasiswa (IOM) yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tjay TH, Rahardja K. Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya. 6 ed. Jakarta: Elex Media Komputindo; 2007. 269-271 hal.
2. Adwan G, Mhanna M. Synergistic Effects of Plant Extracts and Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens. *Middle-East J Sci Res*. 2008;3:134-139.
3. Sari SL, Hakim R, Sulistyowati E. Efek Antibakteri Kombinasi Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dengan Amoksisilin pada *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli* secara in vitro. *J Kedokt Komunitas*. 2020;8(1):1-10.
4. Anugraha D, Risandiansyah R, Faisal. Efek Daya Hambat Kombinasi Alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan Antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol atau Kotrimoksazol Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *J Kedokt Komunitas*. 2018;6(3).
5. Yaumi V, Risadiansyah R, Faisal. Efek Kombinasi Tapak Liman (*Elephantopus Scaber* L.) dengan Antibiotik Amoxicillin, Chloramphenicol Dan Cotrimoxazole Terhadap Daya Pertumbuhan Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* Secara In Vitro. *J Kedokt Komunitas*. 2018;6(3):1-10.
6. Elyani Helmin, Risandiansyah Rio. Antibacterial potential of four herbal plants (*Syzygium cumini*, *Piperornatum*, *Anredera cordifolia*, and *Alpinia galangan*) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Islamic Medicine Research*. 2017.P. 26-33.
7. Soebagio, B., Rusdiana, T., & Khairudin. Pembuatan Gel Dengan Aqupec HV-505 dari Ekstrak Umbi Bawang Merah (*Allium cepa*, L.) sebagai Antioksidan. Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran. Bandung. 2007.

8. Wardati, Firsania Bunga, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah. Efek Daya Hambat Kombinasi Fraksi F33-F37 *E.scabr* (Tapak Liman) dengan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*. Malang: UNISMA. 2019.
9. Harborne, J.B. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Penerbit ITB. Bandung. 2006.
10. Autherhoff, HH., dan Kovar, K.A. (1987). Identifikasi Obat. (edisi 4). Penerjemah: N.C. Sudiarso, Bandung ; Penerbit ITB.Andrews, J.M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48(Supplement S1), pp.5-6. 2001.
11. Risandiansyah, R. 2016. Induction of Secondary Metabolism Across Actinobacterial Genera [Tesis]. Departement of Medical Biotechnology Faculty of Medicine, Nursing and Health Sciences Flinders University. South Australia.
12. Ziaei-Daroukalei, N., Ameri M., Zhraei-Salehi T., et al. AZDAST The New Horizon In Antimicrobial Synergism Detection. National Center for Biotechnology Information.2016
13. Hombach M, Zbinden R, Böttger EC. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader. BMC Microbiol. 2013;13(225).
14. Acker H Van, Coenye T. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. Trends Microbiol. Elsevier Ltd; 2016;20(1):1–11.
15. Ocampo PS, Arnoldini M, Fekete G, Ackermann M, Bonhoeffer S. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(8):4573–82.
16. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(5):1–16.
17. Bollenbach, Tobias. *Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution*. Elsevier. 2015. 27:1–9
18. Mehmood T, Maryam A, Ghramh HA, Khan M, Ma T. as Potential Anticancer
19. Wu Y, Bai J, Huang Y, Qi H, Jiang Y, Gao H. Antibacterial Activity and Membrane-Disruptive Mechanism of 3- p - trans - Coumaroyl-2-hydroxyquinic Acid, a Novel Phenolic Compound from Pine Needles of *Cedrus deodara* , against *Staphylococcus aureus*. Molecules. 2016;21(1):1–12.
20. Acker H Van, Coenye T. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. Trends Microbiol. Elsevier Ltd; 2016;20(1):1–11.
21. Fu L, Pei D, Yu M, Shang H, Si J, Zhang H, et al. New phenolic acids from the whole herb of *Elephantopus scaber* Linn . and their anti- inflammatory activity. 2020;6419.
22. Adina S. Pengaruh Waktu Dan Temperatur Penyimpanan Terhadap Tingkat Degradasi Kadar Amoxicilin Dalam Sediaan Suspensi Amoksisilin- Asam Klavulanat. UIN Jakarta; 2014.
23. Kumar SS, Perumal P, Suresh B. Antibacterial Studies on Leaf Extract of *Elephantopus scaber* Linn. Anc Sci life vol. 2004;23(3):6–8.
24. Daisy P, Mathew S, Suveena S, Rayan NA. A Novel Terpenoid from *Elephantopus Scaber* – Antibacterial Activity on *Staphylococcus Aureus*: A Substantiate Computational Approach. Int J Biomed Sci. 2008;4(3):196–203.
25. Anitha VT, Antonisamy JM, Jeeva S. Antibacterial studies on *Hemigraphis colorata* (Blume) H . G . Hallier and *Elephantopus scaber* L . Asian Pac J Trop Med [Internet]. Hainan Medical College; 2012;5(1):52–7. Diambil dari: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60245-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60245-9)
26. Stefanović O, Comic L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. J Appl Pharm Sci. 2012;2(1):1–5.
27. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. Plants. 2017;6(42):1–23.
28. Jamal RK, Jose V. Determination of phytochemicals by GC-MS in methanol extract of *Elephantopus scaber* L . 2017;6(6):807–13.