

**EFEK KOMBINASI FRAKSI ETIL ASETAT (F1-F8) EKSTRAK METANOLIK
TAPAK LIMAN (*Elephantopus scaber* Linn) DENGAN AMOKSISILIN ATAU
KLORAMFENIKOL TERHADAP ZONA INHIBISI BAKTERI *Staphylococcus aureus*
DAN *Escherichia coli***

Rizka Eliya Pitaloka, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Kasus infeksi nasokomial paling sering disebabkan oleh *S.aureus* dan *E.coli* yang cenderung resisten terhadap antibiotik sehingga perlu kombinasi antibiotik dengan tanaman herbal untuk mengatasi resistensi antibiotik. Penelitian ini mengidentifikasi senyawa aktif fraksi *Elephantopus scaber* melalui uji fitokimia dan menguji ZOI kombinasi fraksi 1-8 *E. scaber* dengan amoksisilin atau kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Metode: Ekstrak metanolik *E.scaber* dilakukan fraksinasi menggunakan fase diam silica gel dan fase gerak 50 ml etil asetat untuk mendapatkan fraksi 1-8. Uji fitokimia fraksi 1-8 menggunakan metode KLT spray dragendorff, FeCl₃, dan formaldehyde. Interaksi antara herbal dengan antibiotik dinilai dengan Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST) dan zona inhibisi diukur dengan metode Kirby-Bauer.

Hasil: Jadi fraksinasi dengan eluen etil asetat didapatkan F1-F8 yang mengandung alkaloid pada F4-F8 dan mengandung fenol pada F6-F8. Uji ZOI tunggal didapatkan adanya zona bening pada fraksi 5-8 terhadap *S. aureus* sebesar 9,33 mm $\pm$ 2,3, 7,3 mm $\pm$ 0,58, 7 mm $\pm$ 0 dan 7,3 mm $\pm$ 0,58, namun pada *E.coli* semua fraksi tidak memiliki zona bening. Pada uji kombinasi fraksi 7 dengan amoksisilin terhadap *S. aureus* bersifat sinergis sedangkan kombinasi fraksi 6-8 dengan kloramfenikol terhadap *S. aureus* bersifat antagonis. Selain kombinasi fraksi tersebut beberapa kombinasi fraksi dengan kloramfenikol terhadap *E.coli* dan amoksisilin terhadap *S.aureus* dan *E.coli* memiliki interaksi *not distinguishable*.

Kesimpulan: Fraksi 4-8 *E. scaber* mengandung senyawa alkaloid dan fraksi 6-8 mengandung senyawa fenol. Kombinasi fraksi 7 *E. scaber* dengan amoksisilin terhadap *S.aureus* bersifat sinergis dan kombinasi fraksi 6-8 dengan kloramfenikol terhadap *S. aureus* bersifat antagonis

Kata Kunci : *Elephantopus scaber*, L., Amoksisilin, Kloramfenikol, Daya hambat, Kombinasi Antibiotik

**EFFECTS OF COMBINATION ETHYL ACETATE FRACTION (F1-F8) OF
METANOLIC EXTRACTS OF *Elephantopus scaber* Linn WITH AMOXICILLIN OR
CHLORAMPHENICOL ON ZONE OF INHIBITION OF *Staphylococcus aureus* AND
*Escherichia coli***

Rizka Eliya Pitaloka, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: The most nasocomial infections are caused by *S. aureus* and *E.coli* which tend to be antibiotics resistance. It need a combination of antibiotic with herbal to overcome antibiotic resistance. This study identified the active compound of *Elephantopus scaber* fraction by phytochemical test and examined ZOI combination of 1-8 *E. scaber* fractions with amoxicillin or chloramphenicol against *S. aureus* and *E.coli*.

Methods: Methanolic extracts of *E.scaber* was fractionated using silica gel stationary phase and the mobile phase of 50 ml ethyl acetate to obtain fraction 1-8. Phytochemical test of fraction 1-8 used TLC method of spray dragendorff, FeCl₃, and formaldehyde. The interaction between herbs and antibiotics was assessed by the Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST) and the zone of inhibition was measured by the Kirby-Bauer method.

Results: Fractionation with ethyl acetate eluent obtained F1-F8 which contained alkaloids at F4-F8 and phenols at F6-F8. On a single ZOI test found a clear zone in the fraction 5-8 against *S. aureus* with value 9.33 mm $\pm$ 2.3, 7.3 mm $\pm$ 0.58, 7 mm $\pm$ 0 and 7.3 mm $\pm$ 0.58, however in all fractions against *E. coli* did not have clear zone. In the combination test of fraction 7 with amoxicillin against *S.aureus* had synergistic interaction, whereas combination of fraction 6-8 with chloramphenicol against *S. aureus* had antagonistic interactions. Beside these fraction combinations, several combinations of fractions with chloramphenicol against *E.coli* and amoxicillin against *S. aureus* and *E.coli* had not distinguishable interactions.

Conclusion: The fraction 4-8 of *E. scaber* contained alkaloid compounds, while fraction 6-8 contained phenol compounds. The combination of fraction 7 of *E. scaber* with amoxicillin against *S. aureus* had synergistic interaction and fraction 6-8 with chloramphenicol against *S. aureus* had antagonistic interactions

Keyword: *Elephantopus scaber*, L., Amoxicillin, Chloramphenicol, Zone of Inhibition, Combination of Antibiotic

*Corresponding author :

Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., Ph.D. Faculty of Medicine, University of Islam Malang
Jl. MT Haryono 193, Malang City, East Java, Indonesian, 65145, Phone : (0341) 551932
e-mail:riorisandiansyah@uisma.ac.id.

PENDAHULUAN

Kasus resistensi semakin meningkat yang menyebabkan infeksi nosokomial di Indonesia mencapai 15,74 % lebih tinggi dari negara-negara maju sekitar 4,8-15,5%.¹ Bakteri penyebab paling sering infeksi nosokomial yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Kedua bakteri ini cenderung resisten terhadap antibiotik.^{2,3} Oleh sebab itu diperlukan cara untuk menurunkan resistensi antibiotik yaitu dengan mengkombinasikan antibiotik dengan herbal seperti tapak liman. Tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) diketahui mengandung terpenoid dan flavonoid yang dapat bekerja sebagai antibakteri.^{4,5}

Beberapa penelitian mengenai kombinasi antibiotik dengan fraksi tanaman herbal telah dilakukan. Salah satunya yaitu penelitian tentang uji fitokimia dan efek kombinasi fraksi tapak liman dengan amoksisilin dan kloramfenikol yang dilakukan di Universitas Islam Malang. Uji fitokimia fraksi semipolar (F9-14) ekstrak metanolik tapak liman ditemukan kandungan senyawa aktif alkaloid dan fenol. Kemudian hasil kombinasi F9-14 ekstrak metanolik tapak liman dengan kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus* dan kombinasi F14 ekstrak metanolik tapak liman dengan amoksisilin memiliki interaksi antagonis.⁶

Dengan demikian dapat diduga bahwa tapak liman dapat mempengaruhi kerja antibiotik. Namun belum ada penelitian tentang kombinasi fraksi etil asetat ekstrak metanol tapak liman dengan antibiotik. Sehingga pada penelitian ini akan dilakukan uji fitokimia fraksi etil asetat ekstrak metanol tapak liman dan juga uji zona hambat kombinasi fraksi etil asetat tapak liman dengan amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium secara *in vitro* untuk mengetahui kandungan fitokimia dan efek dari fraksi etil asetat ekstrak metanol tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) yang dikombinasikan dengan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *Zone of Inhibition* (ZOI) pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari-Mei 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Herbal Medik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Metode Ekstraksi *Elephantopus scaber* Linn

Pembuatan ekstraksi *Elephantopus scaber* L menggunakan metode maserasi yang dimulai dengan mempersiapkan simplisia dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Kemudian simplisia ditimbang dan ditambahkan dengan pelarut dalam rasio 1:10.⁷ Simplisia ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 200 gr dan direndam dengan 2 L metanol PA 96% di dalam Erlenmeyer berukuran

500 mL yang dibagi menjadi 5 Erlenmeyer. Selanjutnya Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 24 jam didalam *shaker water bath*. Setelah itu hasil ekstraksi difiltrasi menggunakan *Vacum buchner* untuk memperoleh filtrat, kemudian filtrat tersebut dievaporasi dengan *Rotary vacuum evaporator* dalam suhu 55°C dengan kecepatan 4 selama 3 jam hingga volume filtrat berkurang menjadi kental dan hasilnya ditampung didalam gelas beker 250 ml (yang telah ditimbang), kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama 3-5 hari. Diamkan sampai menjadi ekstrak kental atau pasta, lalu ditimbang.

Metode Fraksinasi *Elephantopus scaber* Linn

Fraksinasi adalah pemisahan senyawa organik dari campuran menjadi fraksi-fraksi zat murninya berdasarkan kepolaran. Fraksinasi menggunakan kromatografi kolom yang fasa diamnya berupa resin silica gel dan menggunakan fasa gerak etil asetat, air dan metanol. Hasil fraksi ditampung dalam vial yang berbeda untuk setiap warna yang berbeda. Fraksi pada penelitian ini yaitu fraksi etil asetat murni.

Kromatografi Lapis Tipis

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-etil asetat (3:7). Plat KLT yang telah diaktivasi ditotoli dengan hasil fraksi menggunakan *yellow tip* sebanyak 50µL-100µL. Penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan di setiap totolan. Setelah kering plat KLT dimasukkan dalam chamber berisi eluen dan didiamkan hingga pelarut naik sampai batas garis atas plat.

Uji Fitokimia *Elephantopus scaber* Linn

Uji fitokimia yang pertama yaitu mengidentifikasi kandungan alkaloid melalui larutan *dragendorff*. KLT yang sudah ditotoli fraksi etil asetat ekstrak metanolik tapak liman (F1-F8) disemprot dengan reagen *dragendorff* dan secepatnya diamati dan dicatat perubahan warnanya. Terbentuknya spot berwarna coklat-jingga/orangemerah/coklat berlatar belakang kuning menunjukkan adanya kandungan alkaloid di dalamnya.⁸

Uji fitokimia selanjutnya yaitu menggunakan reagen FeCl_3 , untuk mendeteksi adanya kandungan fenol. KLT yang telah disemprot dengan FeCl_3 selanjutnya dipanaskan dengan *hairdryer* selama 10 menit, kemudian diamati dan dicatat perubahan warnanya. Jika terjadi perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, biru dan hitam pekat menunjukkan adanya senyawa fenol.⁸

Selanjutnya reagen *formaldehyde* digunakan untuk mendeteksi kandungan steroid dan terpen. Sebelum mengamati dan mencatat perubahan warna, KLT yang telah disemprot dengan reagen kemudian

dikeringkan dalam suhu ruang. Hasil menunjukkan positif apabila ada perubahan warna kecoklatan.⁹

Metode Pembuatan Larutan Antibiotik

Tahap pertama pembuatan larutan antibiotik yaitu mempersiapkan amoksisilin dan kloramfenikol sebanyak masing-masing 1000 mg yang dilarutkan kedalam 10 ml *aquadest* steril secara terpisah. Antibiotik yang telah dilarutkan digunakan sebagai stok bahan penelitian.

Penyiapan Uji Bakteri dengan Metode Pour Plate

Metode ini dimulai dengan melakukan preparasi inokulum menggunakan spektrofotometer. Oshe steril untuk mentransfer beberapa koloni isolat bakteri dari media padat dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl 0,9% steril 10 ml hingga menjadi keruh. Kemudian dilakukan homogenisasi bakteri menggunakan vorteks. Sampel bakteri diambil dengan mikropipet sebanyak 3 ml dan dimasukkan ke dalam kuvet untuk dibaca melalui spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi dicatat dan diencerkan dengan NaCl 0,9% steril sesuai dengan rumus berikut, dengan target OD_{600nm} adalah 0,2 : Faktor dilusi = (abs. sampel/ abs. target) x volume sampel.

Selanjutnya mempersiapkan media uji aktivitas antimikroba dengan membuat media padat dengan perbandingan natrium agar dan aquades 20g/L, lalu disterilkan menggunakan autoclave. Setelah steril, suhu media diukur dengan termometer cahaya. Jika suhu media kurang dari 50°C, inokulum dimasukkan sebanyak 1% dari media (10 ml/ 1 liter media). Kemudian botol media digerakkan agar inokulum tercampur rata. Media dituang ke dalam cawan petri sampai mengisi setengah ketinggian cawan (sekitar 20 - 25 ml pada cawan 90 mm).

Zone of Inhibition (ZOI) Tunggal dan Kombinasi

Uji ZOI dilakukan menggunakan metode *Kirby-Bauer* dengan sumuran untuk menilai efek ZOI tunggal pada tapak liman, ZOI tunggal antibiotik dan ZOI kombinasi keduanya. Tahap pertama yaitu mempersiapkan biakan agar yang telah diinokulasi *Escherichia coli* dan *S. aureus*, fraksi herbal) tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) serta antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol yang telah diencerkan sesuai dosis yang ditentukan. Biakan agar yang telah berisi bakteri dilubangi dengan *cork borer* sebanyak 10 lubang, selanjutnya sampel yang diujikan dimasukkan sebanyak 30 - 50 µl menggunakan mikropipet, dibiarkan dengan kondisi setengah terbuka di dalam LAF/ BSC selama 30 menit sampai 1 jam. Kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Jika sampel yang diuji tersebut menghambat pertumbuhan bakteri maka akan terbentuk sebuah zona bening (*clear zone*) disekeliling sumuran. Zona bening diukur dengan penggaris dengan satuan mm.

Menurut Davis dan Stout (1971) tingkat kekuatan daya hambat bakteri dapat dikategorikan menjadi lemah, sedang, kuat, dan sangat kuat. Jika

diameter hambat yang diukur ≤ 5 mm maka dikatakan lemah, dikatakan sedang apabila diameter hambat berukuran 5-10 mm, kuat apabila diameter hambat yang diukur 10-20 mm dan sangat kuat apabila diameter hambat yang diukur >20 mm.¹⁰

Berdasarkan hasil penelitian uji ZOI tunggal antibiotik yang dilakukan oleh Bunga (2019) menunjukkan bahwa amoksisilin memiliki luas ZOI lebih besar daripada kloramfenikol pada bakteri *S.aureus* sedangkan pada bakteri *E.coli*, luas ZOI kloramfenikol lebih besar dibandingkan dengan amoksisilin.¹¹

Metode Penentuan Interaksi dengan AZDAST

Hasil ZOI kombinasi herbal dan antibiotik diukur dengan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). Dikatakan sinergis jika diameter zona bening pada kombinasi herbal dan antibiotik (A+B) lebih besar dari herbal tunggal (A) dan antibiotik tunggal (B), dan lebih kecil atau lebih besar dari herbal dosis ganda (AA) dan antibiotik dosis ganda (BB). Antagonis jika A+B lebih kecil dari A atau B. Aditif apabila A+B sama dengan AA dan atau BB. Potensiasi apabila salah satu dari A atau B sama dengan nol, A+B lebih besar dari A dan B, dan lebih kecil atau lebih besar dari AA dan atau BB. Tidak dapat dibedakan apabila A+B sama dengan salah satu dari A atau B.¹²

Analisa Data Statistik

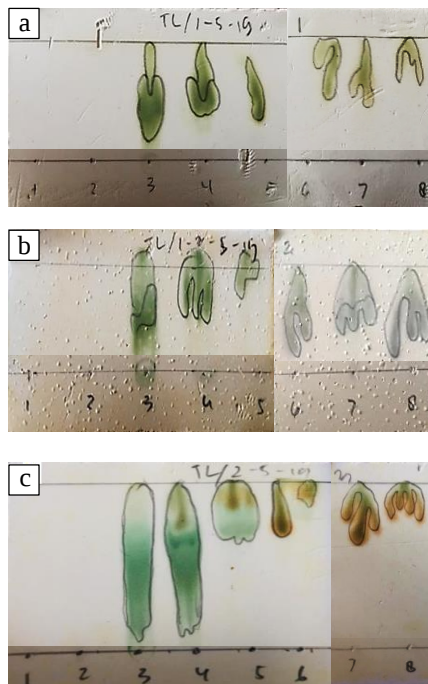
Analisa hasil ZOI kombinasi diukur dengan satuan mm dan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) untuk mendapatkan rata-rata dan standar deviasi. Uji Statistik menggunakan uji non parametrik *Mann-Whitney Test* untuk melihat perbedaan yang signifikan antara ZOI kombinasi dan ZOI tunggal untuk setiap fraksi aktif herbal.

HASIL PENELITIAN

Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia adalah proses mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metanolik fraksi etil asetat tapak liman yang

Pada **Gambar 1** dan **Tabel 1** menunjukkan bahwa fraksi 1 dan 2 tidak memiliki *Rf* dan spot warna pada tiga metode pewarnaan. Berbeda dengan fraksi 3 yang memiliki lima *Rf* namun tidak memiliki spot yang berubah warna. Sama halnya dengan fraksi 3, fraksi 4 juga memiliki lima *Rf* namun hanya ditemukan spot oranye pada pewarnaan reagen *dragendorff* yang mengandung alkaloid. Berbeda dengan fraksi 5 yang memiliki empat *Rf* namun juga memiliki spot oranye pada reagen *dragendorff* yang mengandung alkaloid. Pada fraksi 6, 7 dan 8 memiliki jumlah *Rf* yang berbeda, yaitu tiga *Rf* pada fraksi 6 dan 8 sedangkan fraksi 7 memiliki empat *Rf*. Selain itu fraksi 6, 7 dan 8 memiliki spot biru kehitaman pada pewarnaan FeCl_3 yang mengandung fenol dan spot oranye pada pewarnaan *dragendorff* yang mengandung alkaloid. Sedangkan pada pewarnaan *formaldehyde* tidak didapatkan spot yang berubah warna pada semua fraksi (F1-F8).



Gambar 1 Hasil KLT Spray pada Fraksi 1-8 Tapak Liman; **A.** KLT spray dengan reagent formaldehyde; **B.** KLT spray dengan reagent FeCl_3 ; **C.** KLT spray dengan reagent dragendorff (Gambar disertai perubahan kontras)

Tabel 1 Hasil Perhitungan R_f pada KLT Spray

No. Fraksi	Spray reagent	Warna
F1	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (-)
	Dragendorff	Oranye (-)
F2	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (-)
	Dragendorff	Oranye (-)
F3	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (-)
	Dragendorff	Oranye (-)
F4	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (-)
	Dragendorff	Oranye (+)
F5	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (-)
	Dragendorff	Oranye (+)
F6	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (+)
	Dragendorff	Oranye (+)
F7	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (+)
	Dragendorff	Oranye (+)
F8	Formaldehyde	Cokelat (-)
	FeCl_3	Biru kehitaman (+)
	Dragendorff	Oranye (+)

Keterangan: Formaldehyde = cokelat (+) = Steroid dan/ derivatnya ; FeCl_3 = biru kehitaman (+) = Fenol; dragendorff = oranye (+) = Alkaloid; R_f = Jarak tempuh substansi / Jarak tempuh pelarut (3,8 cm)

Hasil Uji ZOI Secara Tunggal *Elephantopus scaber* L. dan Kombinasi dengan Amoksisilin terhadap Bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

Perhitungan pengukuran ZOI secara tunggal fraksi *Elephantopus scaber* L. dan kombinasi dengan amoksisilin terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Hasil Uji ZOI Tunggal Fraksi 1-8 *Elephantopus scaber* L. Terhadap Bakteri *S. aureus*

Berdasarkan **Gambar 2** dan **Tabel 2** hasil penelitian uji zona hambat fraksi 1-8 *Elephantopus scaber* L. secara tunggal terhadap *S. aureus* didapatkan zona bening pada fraksi 5, 6, 7 dan 8 dengan dosis 15 μl (Fx) sebesar 9,33 mm $\pm$ 2,3, 7,3 mm $\pm$ 0,58, 7 mm $\pm$ 0 dan 7,3 mm $\pm$ 0,58. Sedangkan pada fraksi 1-4 tidak memiliki zona bening.

Hasil Uji ZOI Kombinasi Fraksi 1-8 *Elephantopus scaber* L. dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *S. aureus*

Pada **Gambar 2** dan **Tabel 2** menunjukkan uji kombinasi antara fraksi tapak liman dengan amoksisilin terhadap *S. aureus*. Pada perbandingan kombinasi fraksi 1,2,3,4,5,6,8 dengan amoksisilin terhadap amoksisilin dosis 15 μl didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) pada uji statistik *Mann-Whitney Test*, sehingga semua uji zona inhibisi kombinasi F1,2,3,4,5,6,8 tapak liman dengan amoksisilin terhadap *S. aureus* didapatkan jenis interaksi *not distinguishable*. Namun pada uji kombinasi F7 dengan amoksisilin terhadap *S. aureus* didapatkan hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada uji statistik *Mann-Whitney Test*. Berdasarkan rata-rata dan standar deviasi F7 menunjukkan bahwa uji kombinasi lebih besar dibandingkan dengan kloramfenikol dosis 15 μl sehingga kombinasi F7 tapak liman dengan amoksisilin memiliki jenis interaksi sinergis.

Selain itu menurut **Gambar 2** dan **Tabel 2** menunjukkan uji kombinasi antara F1-F5 tapak liman dengan kloramfenikol terhadap *S. aureus* didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) pada uji statistik *Mann-Whitney Test*, sehingga berdasarkan hasil diatas kombinasi fraksi 1-5 tapak liman dengan kloramfenikol memiliki jenis interaksi *not distinguishable*. Namun pada uji kombinasi F6-F8 dengan kloramfenikol terhadap *S. aureus* didapatkan hasil berbeda signifikan ($p < 0,05$) pada uji statistik *Mann-Whitney Test*. Berdasarkan rata-rata dan standar deviasi F6-F8 menunjukkan bahwa uji kombinasi lebih rendah dibandingkan dengan kloramfenikol dosis 15 μl sehingga kombinasi F6-F8 tapak liman dengan kloramfenikol memiliki jenis interaksi antagonis

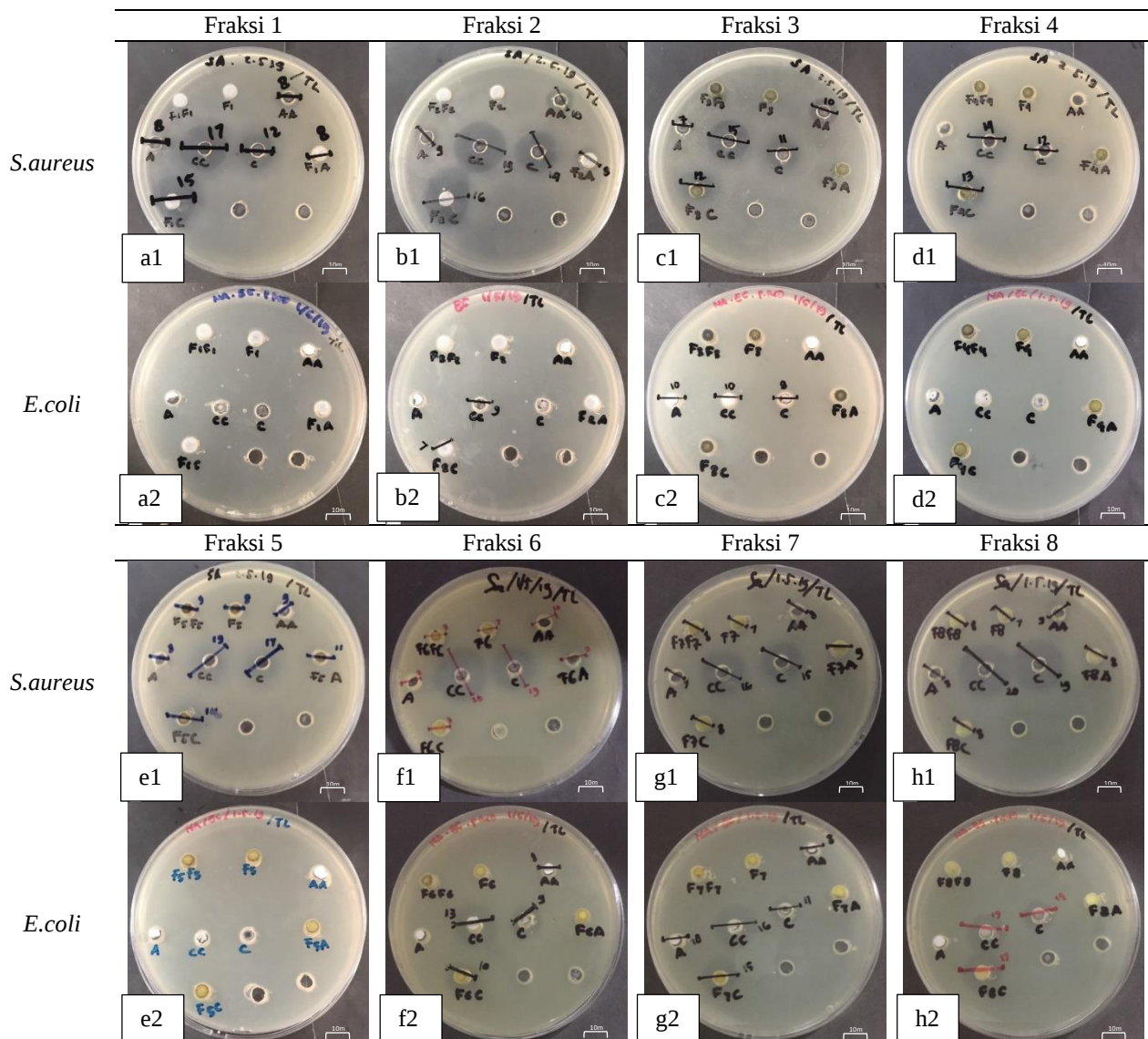
Hasil Uji ZOI Tunggal Fraksi 1-8 *Elephantopus scaber* L. Terhadap Bakteri *E. coli*

Berdasarkan **Gambar 2** dan **Tabel 2** hasil penelitian uji zona hambat fraksi 1-8 *Elephantopus scaber* L. secara tunggal terhadap *E. coli* tidak didapatkan adanya zona bening di semua fraksi.

Hasil Uji ZOI Kombinasi Fraksi 1-8 *Elephantopus scaber* L. dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *E.coli*

Pada **Gambar 2** dan **Tabel 2** menunjukkan uji kombinasi antara fraksi 1-8 tapak liman dengan

amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *E.coli* didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ($p>0,05$) pada uji statistik *Mann-Whitney test*, sehingga berdasarkan hasil diatas kombinasi fraksi 1-8 tapak liman dengan amoksisilin terhadap *E.coli* memiliki jenis interaksi *not distinguishable*



Gambar 2 Hasil Pengujian Bersama Zona Inhibisi Fraksi Tapak Liman dengan Antibiotik terhadap Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*; **a.** Fraksi 1 ekstrak metanolik tapak liman, F1F1= Fraksi 1 dosis 30 μ l, F1= Fraksi 33 dosis 15 μ l, AA= Amoksisilin dosis 30 μ l, A= Amoksisilin dosis 15 μ l, CC= Kloramfenikol dosis 30 μ l, C= Kloramfenikol dosis 15 μ l, F1A= Kombinasi fraksi 1 dan amoksisilin, F1C= Kombinasi fraksi 1 dan kloramfenikol; **b.** Fraksi 2 ekstrak metanolik tapak liman; **c.** Fraksi 3 ekstrak metanolik tapak liman; **d.** Fraksi 4 ekstrak metanolik tapak liman; **e.** Fraksi 5 ekstrak metanolik tapak liman; **f.** Fraksi 6 ekstrak metanolik tapak liman; **g.** Fraksi 7 ekstrak metanolik tapak liman; **h.** Fraksi 8 ekstrak metanolik tapak liman

Tabel 2 Rata-rata Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran *Zone of Inhibition* (ZOI) Kombinasi *Elephantopus scaber*, *L.* dengan Antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E.coli*

No. Fraksi	Sampel	<i>S.aureus</i>		<i>E.coli</i>	
		Rata-rata (mm) $\pm$ SD	Jenis interaksi	Rata-rata (mm) $\pm$ SD	Jenis interaksi
F1	F1F1	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	F1	2 $\pm$ 3,46		0 $\pm$ 0	
	A	5 $\pm$ 4,36	not	0 $\pm$ 0	not
	C	13 $\pm$ 1,73	distinguishable	0 $\pm$ 0	distinguishable
	F1A	5,3 $\pm$ 4,62		0 $\pm$ 0	
	F1C	13,67 $\pm$ 1,16		0 $\pm$ 0	
F2	F2F2	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	F2	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	A	9 $\pm$ 1	not	0 $\pm$ 0	not
	C	13,33 $\pm$ 1,16	distinguishable	0 $\pm$ 0	distinguishable
	F2A	5,67 $\pm$ 4,93		0 $\pm$ 0	
	F2C	14 $\pm$ 2		8,67 $\pm$ 2,08	
F3	F3F3	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	F3	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	C	10,33 $\pm$ 1,16	not	6,33 $\pm$ 5,51	not
	A	2,33 $\pm$ 4,04	distinguishable	6,3 $\pm$ 5,51	distinguishable
	F3A	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	F3C	10,33 $\pm$ 2,08		0 $\pm$ 0	
F4	F4F4	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	F4	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	C	12 $\pm$ 1	not	0 $\pm$ 0	not
	A	5,3 $\pm$ 4,62	distinguishable	0 $\pm$ 0	distinguishable
	F4A	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	
	F4C	13 $\pm$ 1		0 $\pm$ 0	
F5	F5F5	10 $\pm$ 1,73		0 $\pm$ 0	
	F5	9,3 $\pm$ 2,31		0 $\pm$ 0	
	C	16 $\pm$ 1	not	0 $\pm$ 0	not
	A	8,67 $\pm$ 1,16	distinguishable	0 $\pm$ 0	distinguishable
	F5A	10 $\pm$ 1		0 $\pm$ 0	
	F5C	14 $\pm$ 1,73		0 $\pm$ 0	
F6	F6F6	8,3 $\pm$ 0,58	not	0 $\pm$ 0	
	F6	7,3 $\pm$ 0,58	distinguishable	0 $\pm$ 0	
	C	20 $\pm$ 1,73	dengan	11,33 $\pm$ 2,08	not
	A	7,67 $\pm$ 0,58	amoksisilin	0 $\pm$ 0	distinguishable
	F6A	8 $\pm$ 1	Antagonis dengan	0 $\pm$ 0	
	F6C	8 $\pm$ 0 ^a	kloramfenikol	9,67 $\pm$ 0,58	
F7	F7F7	8,3 $\pm$ 0,58		0 $\pm$ 0	
	F7	7 $\pm$ 0	Sinergis dengan	0 $\pm$ 0	
	C	18 $\pm$ 2,65	amoksisilin	9,33 $\pm$ 2,08	not
	A	7 $\pm$ 0	Antagonis dengan	3,3 $\pm$ 5,8	distinguishable
	F7A	8,3 $\pm$ 0,58 ^{ab}	kloramfenikol	0 $\pm$ 0	
	F7C	8 $\pm$ 0 ^a		11,33 $\pm$ 3,22	
F8	F8F8	8 $\pm$ 0	not	0 $\pm$ 0	
	F8	7,3 $\pm$ 0,58	distinguishable	0 $\pm$ 0	
	C	18 $\pm$ 1	dengan	15 $\pm$ 5,57	not
	A	8,3 $\pm$ 0,58	amoksisilin	0 $\pm$ 0	distinguishable
	F8A	7,67 $\pm$ 0,58	Antagonis dengan	0 $\pm$ 0	
	F8C	8 $\pm$ 0 ^a	kloramfenikol	15,67 $\pm$ 4,16	

Keterangan: FxFx= uji ZOI tunggal fraksi tapak liman dosis 30 μ l; Fx= uji ZOI tunggal fraksi tapak liman dosis 15 μ l; AA= uji ZOI tunggal amoksisilin dosis 30 μ l; A= uji ZOI tunggal amoksisilin dosis 15 μ l; FxA= uji ZOI kombinasi fraksi tapak liman dan amoksisilin; CC= uji ZOI tunggal kloramfenikol dosis 30 μ l; C= uji ZOI tunggal kloramfenikol dosis 15 μ l; FxC= uji ZOI kombinasi fraksi tapak liman dan kloramfenikol. ^a signifikan dengan antibiotik, ^b signifikan dengan fraksi tunggal. Nilai AA, CC, dan FxFx disertakan secara lengkap di lampiran

PEMBAHASAN

Jenis Kandungan Senyawa Aktif dari Hasil Uji Fitokimia

Fraksinasi tapak liman dengan eluen etil asetat mendapatkan 8 fraksi yaitu F1-F8. Kemudian dilakukan penelitian uji fitokimia dengan metode KLT spray menggunakan 3 reagen yaitu *dragendorff*, FeCl_3 dan *formaldehyde*. Hasil uji fitokimia pada pewarnaan *dragendorff* ditemukan spot berwarna coklat hingga oranye pada F4-F8 yang diduga mengandung senyawa aktif alkaloid.¹³ Selain itu pewarnaan FeCl_3 didapatkan spot biru kehitaman pada F6, 7 dan 8 yang menandakan terdapat senyawa aktif fenol.⁸ Adanya kandungan senyawa alkaloid dan fenol di dalam fraksi ini karena secara umum etil asetat dapat melarutkan senyawa semipolar seperti flavonoid, alkaloid, polifenol.⁸ Namun seluruh fraksi 1-8 tidak ditemukan spot berwarna kecoklatan yang menunjukkan semua F1-F8 tidak mengandung senyawa steroid dan atau turunannya berupa terpenoid.⁹ Hal ini dikarenakan senyawa steroid, terpenoid, triterpenoid, dan karotenoid dapat larut dalam pelarut non polar seperti lemak dan asam lemak tinggi.¹⁴

Pada uji fitokimia, nilai *Rf* (*Retention factor*) pada plat KLT digunakan untuk mengidentifikasi penyebaran dan pergerakan senyawa terhadap pelarut. Jika nilai *Rf* dalam satu plat memiliki nilai yang sama, maka didapatkan senyawa dengan karakteristik yang sama atau mirip. Semakin kecil nilai *Rf* dan semakin pelan senyawa tersebut bergerak naik, maka kepolaran senyawa semakin meningkat.¹⁵

Analisa Daya Hambat Antibiotik (Amoksisilin dan Kloramfenikol) dan Fraksi Etil Asetat (F1-F8) Tapak Liman secara Tunggal terhadap Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil penelitian uji zona hambat fraksi etil asetat tapak liman (F1-F8) secara tunggal terhadap *S.aureus* didapatkan zona bening pada fraksi 5, 6, 7 dan 8. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat tapak liman dapat menghambat *S.aureus*. Hal ini dapat terjadi karena berdasarkan hasil uji fitokimia fraksi etil asetat mengandung senyawa alkaloid dan fenol. Alkaloid dan fenol merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.¹⁶

Kandungan senyawa paling banyak ditemukan diantara F1-F8 yaitu alkaloid yang terdapat pada fraksi 4 sampai 8. Alkaloid termasuk golongan senyawa metabolit sekunder terbesar yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.¹⁷ Mekanisme senyawa alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan memanfaatkan gugus basa nitrogen pada senyawa alkaloid untuk berikatan dengan gugus asam amino penyusun dinding sel dan DNA bakteri sehingga bakteri inaktif dan mati karena terjadi kerusakan rantai DNA bakteri yang menyebabkan inti dan dinding sel lisis.¹⁸ Selain itu alkaloid dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri sehingga pembentukan lapisan dinding sel tidak utuh sehingga bakteri mati.¹⁹ Mekanisme lain

alkaloid sebagai antibakteri yaitu menjadi interkalator DNA dan menghambat enzim topoisomerase bakteri.²⁰

Selain alkaloid, fraksi etil asetat tapak liman (F1-F8) juga ditemukan senyawa fenol yang terdapat pada fraksi 6 sampai 8. Menurut penelitian, fenol memiliki aktivitas sebagai antibakteri spektrum luas terhadap bakteri gram positif dan gram negatif.²¹ Fenol memiliki kemampuan merusak dan menghambat pembentukan dinding sel bakteri, mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga terjadi kebocoran yang mengganggu transport ion-ion organik yang penting bagi bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat dan mati. Mekanisme lainnya yaitu mengganggu metabolisme bakteri dengan menginaktifkan kerja enzim intraseluler dan mendenaturasi protein sel.²² Kandungan fenol dengan konsentrasi tinggi dapat merusak dinding sel bakteri dan mengendapkan protein dalam sel bakteri sedangkan fenol dengan konsentrasi yang rendah dapat menghambat dan menginaktifkan kerja enzim intrasel bakteri.²¹

Selain karena adanya kandungan senyawa alkaloid dan fenol yang menghasilkan zona bening, karakteristik bakteri juga menjadi faktor adanya zona bening. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang dinding selnya terdiri atas peptidoglikan yang lebih permeable daripada bakteri gram negatif sehingga interaksi antara antibakteri dengan bakteri akan lebih mudah dan bakteri gram positif menjadi lebih rentan terhadap antibakteri. Sedangkan *Eschericia coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan di bagian dalam dan lapisan lipopolisakarida yang bersifat kurang permeabel sehingga tidak mudah untuk ditembus oleh antibakteri dan interaksi dengan antibakteri menjadi tidak mudah.²³ Maka dari itu pada uji zona hambat tunggal fraksi etil asetat (F1-F8) tapak liman terhadap *Eschericia coli* tidak didapatkan adanya zona bening di semua fraksi.

Analisa Daya Hambat Kombinasi Fraksi 1-8 Tapak Liman dan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Berdasarkan hasil penelitian uji kombinasi antara fraksi tapak liman dengan amoksisilin dan kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus* dan *E.coli* yang telah diolah melalui SPSS non parametrik *Mann-Whitney Test* dan dinilai menggunakan metode AZDAST menunjukkan bahwa interaksi antara kombinasi fraksi 1 sampai 8 tapak liman dengan amoksisilin dan kloramfenikol terhadap bakteri *E.coli*, tidak berbeda signifikan ($p>0,05$) dan tidak dapat dibedakan (*Not Distinguishable*). Hasil ini didapatkan karena zona bening yang dihasilkan oleh amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *E.coli* tidak dipengaruhi oleh fraksi 1-8 tapak liman. Hal ini juga berlaku pada hasil interaksi kombinasi fraksi 1,2,3,4,5,6,8 tapak liman dengan amoksisilin dan fraksi 1-5 tapak liman dengan kloramfenikol terhadap *S.aureus* yang tidak berbeda signifikan

($p > 0,05$) dan tidak dapat dibedakan (*Not Distinguishable*).

Hasil interaksi *not distinguishable* pada penelitian ini diduga karena beberapa faktor, yaitu amoksisilin dan kloramfenikol menggunakan pelarut air sehingga tidak stabil yang seharusnya amoksisilin dilarutkan menggunakan dapar sedangkan kloramfenikol menggunakan etanol, dan terpapar suhu ruang yang terlalu lama yang menyebabkan stabilitas antibiotik menurun. Suhu yang terlalu tinggi mampu menurunkan stabilitas dan kadar antibiotik. Amoksisilin akan lebih stabil pada suhu 4-8° C dibandingkan suhu ruang 27-29°C.²⁴

Selain didapatkan hasil interaksi *not distinguishable*, kombinasi fraksi 7 tapak liman dengan amoksisilin terhadap *S. aureus* memiliki interaksi sinergis karena hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) uji statistik *Mann-Whitney Test* dan uji kombinasi memiliki rata-rata dan standar deviasi lebih tinggi dibandingkan dengan amoksisilin dosis 15µl dan fraksi 7 tunggal. Fraksi 7 dapat meningkatkan aktivitas amoksisilin karena mengandung senyawa fenol. Salah satu senyawa polifenol yaitu *Epigallocatekin gallat* (EGCg) merupakan antibiotik bakterisidal dengan cara berikatan dengan peptidoglikan yang menyebabkan dinding sel rusak dan bakteri mati. Hal ini selaras dengan cara kerja amoksisilin yang juga merusak dinding sel bakteri dengan menghambat pembentukan dinding sel. Sehingga EGCg mampu membantu amoksisilin dalam membunuh bakteri dan interaksi kombinasi antara F7 tapak liman dengan amoksisilin menjadi sinergis.²⁵

Kombinasi fraksi 6,7 dan 8 tapak liman dengan kloramfenikol terhadap *S. aureus* memiliki interaksi antagonis karena didapatkan hasil yang berbeda signifikan pada uji statistik *Mann-Whitney Test* dan menurut rata-rata dan standar deviasi F6-F8 menunjukkan bahwa uji kombinasi lebih rendah dibandingkan dengan kloramfenikol dosis 15µl. Hasil interaksi antagonis ini juga disebabkan oleh senyawa fenol yang terdapat pada fraksi 6,7 dan 8. Senyawa polifenol EGCg dapat menurunkan kerja kloramfenikol dengan cara berikatan dengan protein transporter yang menyebabkan kloramfenikol tidak dapat berikatan dengan bakteri dan mengganggu aktivitas antibakteri kloramfenikol.²⁶ Sehingga interaksi kombinasi antara fraksi 6,7 dan 8 dengan kloramfenikol menjadi antagonis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. Fraksi etil asetat 4 sampai 8 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* memiliki senyawa alkaloid.
2. Fraksi etil asetat 6 sampai 8 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* memiliki senyawa fenol.

3. Fraksi etil asetat 5 sampai 8 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* memiliki daya hambat terhadap bakteri *S. aureus*.
4. Fraksi etil asetat 1-8 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri *E. coli*.
5. Kombinasi fraksi etil asetat 1-8 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* dengan amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *E. coli* tidak berinteraksi
6. Kombinasi fraksi etil asetat 1,2,3,4,5,6,8 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* dengan amoksisilin dan fraksi 1-5 kloramfenikol terhadap *S. aureus* tidak berinteraksi
7. Fraksi etil asetat 7 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* meningkatkan aktivitas antibiotik amoksisilin terhadap *S. aureus*
8. Fraksi etil asetat 6, 7, dan 8 ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* menurunkan aktivitas antibiotik kloramfenikol terhadap *S. aureus*

SARAN

Adapun saran untuk mengembangkan dan meningkatkan penelitian ini kedepannya adalah:

1. Melarutkan antibiotik dengan pelarut yang sesuai, yang memiliki solubilitas dan stabilitas tinggi. Seperti amoksisilin menggunakan dapar dan kloramfenikol menggunakan etanol.
2. Melakukan penelitian lanjutan uji *Zone of Inhibition* (ZOI) pada fraksi etil asetat (F1-F8) ekstrak metanolik *Elephantopus scaber*, *L.* dengan meningkatkan konsentrasinya untuk untuk mempengaruhi daya hambat pada kombinasi *Elephantopus scaber*, *L.* dengan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.
3. Melakukan isolasi dan identifikasi senyawa aktif pada fraksi 1-8

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang telah mendanai penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Firmansyah AT. **Pemeriksaan Bakteri Total Udara Dan Kuman Staphylococcus aureus Dalam Ruang Operasi Di Rumah Sakit Umum Daerah Kota Semarang** (Doctoral Dissertation, Diponegoro University). 2007.
2. Sjamsuhidajat R, and Jong WD. **Buku-Ajar Ilmu Bedah**. Jakarta : Balai Penerbit FKUI. 2005.
3. Kumar F, Ramzi SC, and Stanley R. **Buku Ajar Patologi**. Edisi 7. Jakarta : EGC. 2007.
4. Cowan MM. **Plant products as antimicrobial agents**. Clinical microbiology reviews. 1999 Oct 1;12(4):564-82.

5. Daisy P, Salu Mathew SS, Rayan NA. **A novel terpenoid from *Elephantopus scaber*–antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*: a substantiate computational approach.** International journal of biomedical science: IJBS. 2008 Sep;4(3):196.
6. Boesary MH, Faisal, Risandiansyah R. **Efek Penambahan Fraksi Semi-Polar (F9-F14) Ekstrak Metanolik *Elephantopus scaber* L. Terhadap Daya Hambat Amoksisilin atau Kloramfenikol Pada *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli*.** Jurnal Bio Komplementer Medicine. 2019 Sep 30;6(3).
7. Helmin E, Rio R. **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;26-33.
8. Harborne JB. **Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan.** Bandung: Penerbit ITB. 1987:78.
9. Burns DT. H. Jork, W. Funk, W. Fischer and H. Wimmer, **Thin-layer chromatography: Reagents and detection methods, vol. Ib, Physical and chemical detection methods: Activation reactions, reagent sequences, reagents II: VCH, Weinheim, 1994**
10. Davis WW. Stout. 1971. **Disc plate methods of microbiological antibiotic assay.** Microbiologi.;22(4):659-65.
11. Wardati FB, Fadli Z, Risandiansyah R. **Efek Daya Hambat Kombinasi Fraksi F33-F37 *E. scaber* (Tapak Liman) dengan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.**
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. Marlina SD, Suryanti V. Suyono. 2005. **Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis komponen kimia buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz) dalam ekstrak etanol.** Biofarmasi. 2015;3(1):26-31.
14. Depkes RI. **Analisis Obat Tradisional.** Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm. 1987;72:74.
15. Lipsy P. **Thin layer chromatography characterization of the active ingredients in excedrin and anacin.** Department of Chemistry and Chemical Biology, Stevens Institute of Technology: Castle Point on Hudson. 2010.
16. Tristyanto N. **Daya Anti Bakteri Ekstrak Buah mahkota dewa Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*.** Analis Kesehatan Akademi Analis Kesehatan Malang. 2011;1(1):1-0.
17. Robinson, T. **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi.** Edisi VI, Hal 191-216, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB. 1995.
18. Gunawan IW, Gede Bawa IG. Sutrisnayanti. **Isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid yang aktif antibakteri pada herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn).** Jurnal Kimia. 2008;2(1):31-9.
19. Darsana IG, Besung IN, Mahatmi H. **Potensi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara In vitro.** Indonesia Medicus Veterinus. 2012;1(3):337-51.
20. Karou D, Savadogo A, Canini A, Yameogo S, Montesano C, Simpore J, Colizzi V, Traore AS. **Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*.** African journal of biotechnology. 2006;5(2):195-200.
21. Oliver SP, Gillespie BE, Lewis MJ, Ivey SJ, Almeida RA, Luther DA, Johnson DL, Lamar KC, Moorehead HD, Dowlen HH. **Efficacy of a new premilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis.** Journal of dairy science. 2001 Jun 1;84(6):1545-9.
22. Damayanti E, Suparjana TB. **Efek penghambatan beberapa fraksi ekstrak buah mengkudu terhadap *Shigella dysenteriae*.** Di dalam: Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan 2007.
23. Adu F, Gbedema SY, Akanwariwak WG, Annan K, Boamah VE. **The effects of *Acanthospermum hispidum* extract on the antibacterial activity of amoxicillin and ciprofloxacin.** Hygeia Journal for Drugs and Medicines. 2011;3(1):58-63.
24. Talogo AS. **Pengaruh Waktu dan Temperatur Penyimpanan Terhadap Tingkat Degradasi Kadar Amoksisilin dalam Sediaan Suspensi Amoksisilin–Asam Klavulanat.** 2014.
25. Zhao WH, Hu ZQ, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. **Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001 Jun 1;45(6):1737-42. Mensah, J. L., Lagarde, I., Ceschin, C., Michel, G., Gleye, J., Fouraste, I. **Antibacterial Activity Of The Leaves Of *Phyllanthus discoideus*.** J. Ethnopharmacol. 1990; 28: 129–133.
26. Roccaro AS, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D, Enea V. **Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in *Staphylococci* by inhibiting its efflux from bacterial cells.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004 Jun 1;48(6):1968-73.