

EFEK KOMBINASI FRAKSI POLAR F27- F32 *Elephantopus scaber* Linn DENGAN AMOXICILIN DAN CHLORAMPHENICOL TERHADAP DAYA HAMBAT PADA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

Fitri Rizqiyana Dewi, Rio Risandiansyah, Zainul Fadli

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

Email: rizqiyanafitrii@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Penyakit akibat infeksi masih menjadi salah satu permasalahan kesehatan di Indonesia. Penggunaan antibiotik yang tepat dapat menurunkan tingkat kejadian infeksi dan resistensi. Selain itu, resistensi dapat diatasi dengan meningkatkan kerja antibiotik melalui kombinasi dengan herbal yang memiliki senyawa aktif antibiotik, seperti *Elephantopus scaber* Linn. *E.scaber* tumbuhan yang sudah pernah dilakukan penelitian didapatkan kandungan flavonoid, steroid dan alkaloid. Penelitian ini bertujuan menguji kelompok senyawa polar yang belum diteliti sebelumnya dan mengkombinasi fraksi *E.scaber* dengan antibiotik Amoxicillin dan Chloramphenicol dalam perubahan daya hambat *S.aureus* dan *E.coli*.

Metode: Ekstrak metanol difraksinasi dengan fase diam menggunakan silica gel dan fase gerak menggunakan etil asetat murni. Interaksi antara herbal dengan antibiotik dinilai berdasarkan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST) dan penilaian daya hambat menggunakan metode *Kirby-Bauer*. Uji fitokimia dilakukan dengan spray *formaldehyde*, $FeCl_3$, dan *dragendorff* pada Kromatografi Lapis Tipis. Hasil diuji dengan SPSS dan dianggap signifikan jika $p < 0,05$.

Hasil: Dari keseluruhan hasil fraksi, pada fraksi 27,28,29,30 dan 32 didapatkan hasil Uji Fitokimia Fraksi 27 memiliki senyawa alkaloid, fenol, dan saponin sedangkan fraksi 28-31 memiliki senyawa alkaloid dan fenol. Fraksi 32 memiliki senyawa alkaloid. Kombinasi Antibiotik Fraksi 27 dan 28 memiliki interaksi antagonis dengan Chloramphenicol terhadap *E.coli* dengan nilai ZOI $8,6 \pm 8,6$ dan $9,0 \pm 0,0$ dan signifikansi ($p > 0,05$) sedangkan pada Fraksi 30 Chloramphenicol terhadap Bakteri *S. aureus* memiliki interaksi Antagonis dengan nilai ZOI $13,6 \pm 3,0$ dan signifikansi ($p > 0,05$). Pada kombinasi antibiotik Amoxicillin terhadap *S.aureus* dan *E.coli* di dapatkan jenis interaksi *not distinguishable*.

Kesimpulan: F27- F32 Herbal tunggal *E. Scaber* tidak memiliki aktivitas antimikrobia. Fraksi 27 memiliki senyawa alkaloid, fenol, dan saponin sedangkan fraksi 28-31 memiliki senyawa alkaloid dan fenol. Fraksi 32 memiliki senyawa alkaloid.

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

INHIBITORY EFFECTS OF POLAR FRACTION F27-F32 *E. scaber* EXTRACT IN COMBINATION WITH AMOXICILIN AND CHLORAMPHENICOLE AGAINST *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*

Fitri Rizqiyana Dewi, Rio Risandiansyah, Zainul Fadli

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Email : rizqiyanafitrii@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Infectious disease is major problem in Indonesia. The right antibiotic infiltration strategy will reduce incidence rate of infection and resistance. Moreover, resistance can be overcome by increasing antibiotics action by combining it with herbs which have an active antibiotic compound such as *Elephantopus scaber* Linn. *E. scaber* is a herb that has already been carried out by research which is found to contain flavonoids, steroids and alkaloid. This research aims to examine the group of polar compound, and examine those compound combinations with amoxicillin and chloramphenicol, measure the inhibition change toward *S.aureus* and *E. coli*.

Methods : The Methanol Extract is fractionated with silence phase by using *Silica Gel* and motion phase by using pure *ethylacetate*. The interaction between herbs and antibiotics is assessed by *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST) method and the assessment of inhibition is by using *Kirby-Bauer* method. Phytochemical test is done with *formaldehyde* spray, $FeCl_3$, and *dragendorff* of thin layer of chromatography. The result was analyzed by using SPSS with the significant level of $p < 0,05$.

Results: Phytochemical test fraction 27 has Alkaloid, Fenol, and Saponin compound while fraction 28-31 has Alkaloid and Fenol compound. Fraction 32 has Alkaloid compound. The combination of antibiotics fraction 27 and 28 has antagonist interaction with chloramphenicol against *E. Coli* with ZOI values $8,6 \pm 8,6$ and $9,0 \pm 0,0$ and significance ($p > 0,05$) while on fraction 30 chloramphenicol against *S. Aureus* Bacteria has antagonistic interaction with ZOI values $13,6 \pm 3,0$ and significance ($p > 0,05$). In the combination of amoxicillin antibiotics against *S. Aureus* and *E. Coli* obtained type of interaction is not distinguishable.

Conclusion: Single herbal F27-32 has no antimicrobial activity. In fraction 27 contains alkaloid, saponins, and phenol, while fraction 28-31 contains alkaloid and phenol. Fraction 32 contains alkaloid compound.

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

PENDAHULUAN

Perkembangan penyakit Infeksi masih menjadi permasalahan kesehatan utama di berbagai negara, terutama di Indonesia sebagai negara berkembang¹. Permasalahan penyakit akibat infeksi yang paling sering menyebabkan infeksi ialah bakteri *S. aureus* dan *E. Coli*². Bakteri *S. aureus* dan *E. Coli* merupakan bakteri patogen yang banyak menyerang manusia. *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang hidup di dalam saluran kelenjar keringat, daerah perineum dan inguinal, dan nares anterior². Sedangkan, *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang banyak ditemukan pada usus besar dan merupakan flora normal di dalam tubuh manusia, dimana akan menjadi patogen apabila dalam jumlah banyak³.

Berdasarkan hasil penelitian dari Antimicrobial Resistant in Indonesia (AMRIN-Study) Pada tahun 2005, ditemukan peningkatan resistensi *E. coli* meningkat 20% di rumah sakit Surabaya⁴. Sedangkan Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan *S. aureus* yang resisten terhadap metisilin dan antibiotik golongan beta-laktam⁵. Amoxicillin adalah antibiotik spektrum luas sering diberikan pada pasien untuk penyakit seperti pneumonia, otitis, sinusitis, infeksi saluran kemih, peritonitis, dan penyakit lainnya⁶. Chloramphenicol sudah banyak digunakan sebagai terapi lini pertama untuk demam tifoid dan meningitis oleh *H. Influenza*⁷.

Mikroorganisme yang diberikan antibiotik awalnya sensitif dapat menjadi tidak sensitif menjadi resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti intensitas paparan pada suatu wilayah serta penggunaan antibiotik yang tidak terkendali⁸. Jika kasus infeksi terus meningkat akibat berbagai macam mikroba serta peningkatan terhadap resistensi antibiotika, maka akan mengakibatkan kesulitan dalam penanganan penyakit infeksi⁸.

Selain dengan obat-obatan antibiotik, infeksi bakteri dapat diatasi dengan penggunaan kombinasi antibiotik dengan herbal. Tumbuhan *E.scaber* Linn adalah salah satu tumbuhan yang sudah dilakukan penelitian didapatkan kandungan flavonoid, steroid dan alkaloid pada *E.scaber* Linn dapat digolongkan sebagai antimikroba berspektrum luas karena dapat menghambat bakteri gram positif dan gram negatif⁹. Hasil yang diberikan pada pemberian kombinasi antibiotik dengan tanaman herbal dapat bersifat sinergis dan antagonis. Sifat sinergis adalah apabila berpotensi meningkatkan penyembuhan terhadap infeksi bakteri, sedangkan sifat antagonis adalah apabila menyebabkan penurunan efek dari antibiotik¹⁰.

Sebagai lanjutan dari penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Yaumi *et al.*, (2018) kombinasi amoxicillin dengan ekstrak *E.scaber* Linn pada bakteri *E.coli* dan *S.aureus*

menunjukkan hasil antagonis. Kombinasinya dengan chloramphenicol dan cotrimoxazole dengan ekstrak *E.scaber* Linn pada bakteri *S. aureus* dan *E.coli* bersifat aditif. Hal ini dapat dikatakan bahwa kombinasi chloramphenicol dengan ekstrak *E.scaber* Linn tidak cukup kuat untuk dapat membunuh bakteri. Hal ini diduga karena senyawa yang di dapat dari ekstrak herbal *E. scaber* Linn. masih berupa *mixed compound* sehingga akan mempengaruhi interaksi dengan antibiotik pada bakteri *E.coli* dan *S.aureus*.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Penelitian ini dilaksanakan pada Januari hingga Mei 2019 di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNISMA dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNISMA.

Pembuatan Ekstrak Metanolik *E.scaber*.

Simplisia *E.scaber* didapatkan dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) ditimbang sebanyak 40 g menggunakan neraca digital. Simplisia 40 g dilarutkan dalam pelarut metanol 96% PA sebanyak 400 ml dalam tabung Erlenmeyer. Larutan tersebut ditutup dengan aluminium foil dan dimasukkan kedalam shaker water bath dengan kecepatan 5 selama 18-24 jam. Ekstrak disaring menggunakan *vaccum Buchner* yang dilapisi dengan kertas saring halus sebanyak 3 lapis. Hasil dari saringan ekstrak (filtrate) dievaporasi dengan suhu 55°C dan kecepatan putaran 4 hingga 5, sampai menjadi ekstrak kental. Hasil ekstrak ditutup dengan aluminium foil dan diletakkan di inkubator dengan suhu 50 °C.

Metode Fraksinasi *Elephantopus scaber* Linn

Pada Tahapan proses ini ekstrak pekat metanol tanaman herbal *E.scaber* difraksinasi menggunakan Kromatografi kolom dengan fasa diam yang digunakan resin silica gel dan fasa gerak yang digunakan campuran pelarut etil asetat dengan rasio 9:1. Setelah didapatkan hasil fraksinasi sebanyak 36 fraksi, pada fraksi 27-32 didapatkan kandungan metanol yang kemudian dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengkonfirmasi hasil dari kromatografi kolom secara kualitatif, dimana fraksi-fraksi yang memiliki senyawa yang sama dijadikan satu fraksi. Fraksi ditotolkan menggunakan *yellow tip*, diatas lempeng pelat KLT yang telah diaktifasi dalam oven dengan suhu 50°C dalam waktu 15 menit.

Pelat KLT dilakukan menggunakan F254 Silica Plate dengan eluent metanol-etil asetat dengan perbandingan 7:3 hingga pelarut mengembang mencapai batas atas.

Screening Fitokimia

Screening fitokimia dilakukan untuk proses pendeteksian terhadap tanaman yang diduga memiliki potensi sebagai obat herbal, untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam suatu tanaman. Uji fitokimia pertama adalah menentukan kandungan alkaloid, dilakukan dengan menyempotkan larutan Dragendoff pada KLT yang sudah ditotolkan fraksi 27-32 ekstrak metanolik *E.sacber*, perubahan warna diamati. Reagen Dragendoff umumnya berubah warna menjadi kuning keemasan. Uji fitokimia kandungan fenol dilakukan dengan reagen FeCl_3 . Reagen disempotkan pada KLT lalu diamati perubahan warnanya. Ekstrak *E.scaber* dianggap memiliki kandungan fenol jika berubah warna menjadi biru kehitaman. Uji fitokimia kandungan steroid, alkaloid, saponin, dan derivat phenothiazine dilakukan dengan reagen formaldehyde. Ekstrak *E.scaber* disempotkan pada KLT lalu diamati perubahan warnanya dan dianggap memiliki kandungan fenol jika berubah warna menjadi kecoklatan. Pelat KLT dikeringkan kemudian lakukan penghitungan Rf dengan rumus:

$$R_f = \frac{(\text{jarak noda})}{(\text{jarak elusi})}$$

Pembuatan Larutan Antibiotik

Pada penelitian ini menggunakan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol yang dilarutkan dengan aquadest steril. Pembuatan larutan antibiotik dimulai dengan mempersiapkan antibiotik tablet Amoksisilin dan kapsul Kloramfenikol 1000 mg setelah itu dilarutkan kedalam 10 ml aquadest steril untuk mencapai konsentrasi 100 mg/ml, lakukan secara terpisah sesuai antibiotik yang di perlukan dan dijadikan sebagai stok bahan penelitian. Kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh dilusi yang digunakan untuk uji ZOI tunggal antibiotik dalam memperoleh dosis yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pengenceran dilakukan sebanyak 10 kali dari stok antibiotik yang sudah dibuat sebelumnya. Sehingga didapatkan beberapa dilusi yaitu $1, \frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{8}, \frac{1}{16}, \frac{1}{32}, \frac{1}{64}, \frac{1}{128}, \frac{1}{256}$, dan $\frac{1}{512}$. Pengenceran untuk memperoleh dilusi dilakukan dengan cara mengambil setengah volume dari dilusi sebelumnya dan diencerkan dengan aquadest steril dengan volume yang sama pada tabung reaksi steril yang baru, sampai pada dilusi ke-10. Kemudian dilakukan uji ZOI tunggal antibiotik pada bakteri untuk menentukan dosis yang digunakan dalam kombinasi.

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. Vorteks dilakukan untuk homogenisasi bakteri dengan mikropipet. Vortex 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 $0,2 : \text{Faktor dilusi} = (\text{abs. sampel} / \text{abs. target}) \times \text{volume sampel}$. Pengenceran dilakukan sesuai rumus di atas dengan NaCl 0,9% steril. Bakteri yang sudah diencerkan hingga jumlahnya 10^8 dilarutkan dalam media agar sebanyak 1% (10 ml/1 L media). pada dilusi ke-1 (10mg/ml) sampai ke-3 (2,5mg/ml) dengan masing-masing rerata $11,2 \pm 6,1$ dan $8,3 \pm 1,6$. Sedangkan hasil pada antibiotik tunggal Chloramphenicol terhadap *E.coli* di dapatkan ZOI pada dilusi ke-1 (10mg/ml) dan ke-2 (5mg/ml) dengan masing-masing rerata $14,0 \pm 1,0$ dan $6,3 \pm 1,5$. Pada bakteri *E.coli* hasil ZOI pada dilusi ke-1 lebih besar pada antibiotik tunggal Chloramphenicol dibanding dengan antibiotik tunggal amoxicillin.

Media agar yang telah diberi bakteri dibuat sumuran berdiameter ± 6 mm. Antibiotik ataupun herbal diletakkan secara terpisah pada lubang sumuran media agar. Plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening disekitar sumuran diukur dengan menggunakan penggaris millimeter. ZOI kombinasi antibiotik dengan *E.scaber* dibuat menggunakan 1 dosis berbeda dari tiap bahan cobanya. Dosis yang dipakai merupakan dosis ZOI tunggal dengan diameter <10 mm dengan volume $15\mu\text{L}$. Sehingga volume total pada ZOI kombinasi adalah $30\mu\text{L}$ tiap sumuran.

ZOI kombinasi antibiotik dengan *E.scaber* dibuat sama dengan pengujian ZOI tunggal namun dengan melakukan kombinasi dari antibiotik dan tanaman herbal dengan menggunakan 1 dosis dari hasil penghitungan ZOI tunggal antibiotik maupun herbal.

Analisa Data Statistik

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 tunggalnya.

Efek interaksi antara herbal dan antibiotik dievaluasi menggunakan metode AZDAST. Hasil dikatakan sinergis apabila A+B lebih besar dari A dan B dan lebih kecil atau lebih besar dari A+A atau B+B. Hasil dikatakan aditif apabila A+B sama dengan A+A atau B+B. Hasil dikatakan antagonis jika A+B lebih kecil dari A atau B¹².

HASIL

Hasil Uji Fitokimia Fraksi 27-32 Ekstrak Metanolik *E.scaber*

Screening fitokimia merupakan uji yang dilakukan untuk memberikan gambaran suatu senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti, dengan melihat reaksi pengujian perubahan warna menggunakan suatu pereaksi warna. Uji Screening fitokimia dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) spray pada Fraksi 27 sampai fraksi 32 *E.scaber* yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3. dan Tabel .2



Gambar 3. Hasil KLT Spray pada Fraksi 27-32 Ekstrak Metanolik *E.scaber*

Tabel 2. Hasil Identifikasi Fitokimia

No Fraksi	Alkaloid (DGF)	Fenol (FeCl ₃)	Steroid (FMD)
27*	+	+	+
	(oranye)	(Biru Kehitaman)	(KK)
28*	+	+	-
	(oranye)	(Biru Kehitaman)	
29*	+	+	-
	(oranye)	(Biru Kehitaman)	
30*	+	+	-
	(oranye)	(Biru Kehitaman)	
31*	+	+	-
	(oranye)	(Biru Kehitaman)	
32*	+	-	-
	(oranye)		

Keterangan : *Tailing, DGF, Dragendorff, FMD; formaldehyde, KK; Kuning kecoklatan

Pada tabel .2 menunjukan hasil terdapat kandungan senyawa alkaloid pada fraksi 27,28,29,30,31 dan 32 dengan nilai Rf secara berurutan dari F27-F32 yaitu 0,89 ;0,91 ;0,91 ;0,89 ;0,81 dan 0,78 ditandai dengan didapatkan perubahan warna menjadi warna orange. Kandungan senyawa Fenol (FeCL₃) terdapat pada fraksi 27,28,29,30 dan 32 dengan nilai Rf secara berurutan 0,78; 0,78 ; 0,78 ;0,78 ;0,92 dan 0,92 ditandai dengan didapatkan perubahan warna biru kehitaman. Kandungan senyawa steroid hanya di dapatkan pada fraksi F27 dengan nilai Rf 0,89, sedangkan ada F28,F29,F30,F31 dan F32 tidak didapatkan spot kuning kecoklatan dengan nilai Rf secara berurutan 0,78 ; 0,78 ; 0,78 ; 0,92 dan 0,92.

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

Linn dengan Amoxicilin dan Chloramphenicol pada *S.aureus*

Uji ZOI kombinasi antara *E.scaber* dengan antibiotik Chloramphenicol dan Amoxicilin pada *E.coli*. Uji ZOI kombinasi menggunakan 1 dosis tunggal antibiotik pada Amoxicilin dan Chloramphenicol. Hasil pengukuran dari ZOI kombinasi dapat dilihat pada gambar 1. Pengamatan dan penghitungan uji zona inhibisi pada *E.scaber* dan Amoxicilin terhadap bakteri *S. aureus*.

Hasil uji ZOI tunggal pada *E.scaber* dan Amoxicilin tidak memiliki zona inhibisi, baik dengan dosis 30µl maupun 15µl. Pada uji ZOI kombinasi antara Tapak Liman dengan Amoxicilin juga tidak memiliki zona inhibisi, Sehingga tidak dilakukan perhitungan pada data.

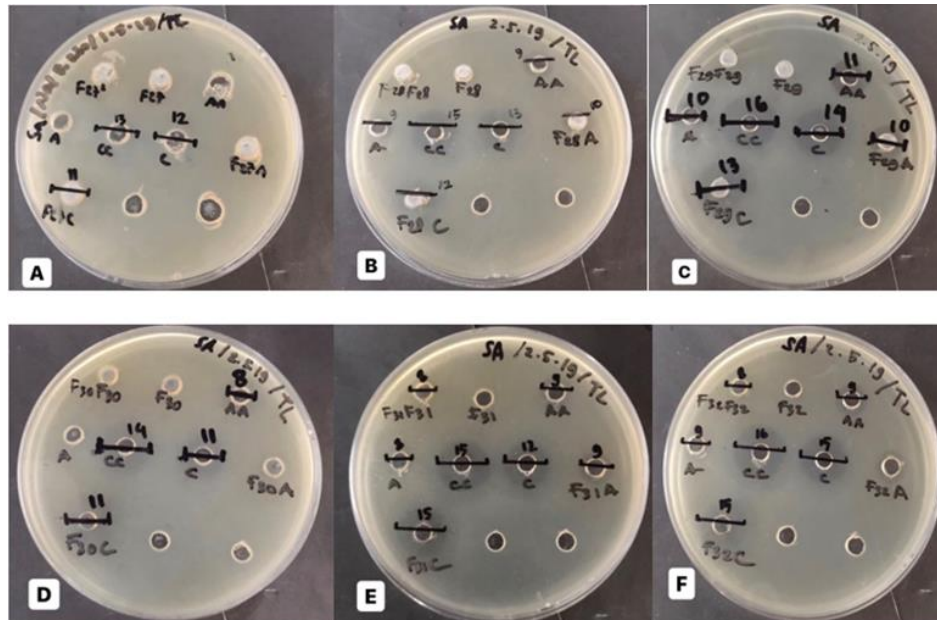
Pada Tabel 1 menunjukkan uji kombinasi antara fraksi *E.scaber* dan Chloramphenicol. Pada fraksi 27, 28, 29, 30, 31, dan 32 didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ($p>0,05$) pada uji statistik Mann-Whitney Test , sehingga antara 6 fraksi *E.scaber* yang diuji dengan Amoxicilin pada bakteri *S. aureus* memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.

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

Hasil Uji ZOI kombinasi antara *E.scaber* dengan antibiotik Amoxicilin dan Chloramphenicol pada *E.coli*. Uji ZOI kombinasi menggunakan 1 dosis tunggal antibiotik pada Chloramphenicol dan Amoxicilin.

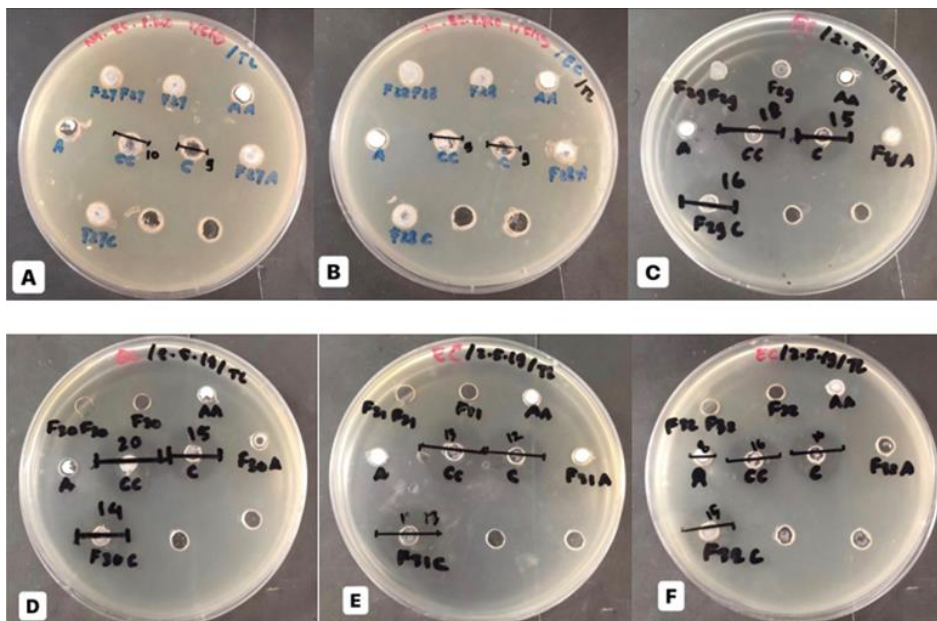
Pada Tabel 1 tersebut menunjukkan uji kombinasi antara fraksi *E.scaber* dan Chloramphenicol. Pada fraksi 27, 28, 29, 30, 31, dan 32 didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ($p>0,05$) pada uji statistik Mann-Whitney Test , sehingga antara 5 fraksi 27,28,29,31 dan 32 fraksi *E.scaber* yang diuji dengan Chloramphenicol pada bakteri *E.coli* memiliki jenis interaksi *not distinguishable*. Pada Fraksi 30 dengan hasil kombinasi lebih kecil dibandingkan dengan herbal tunggal dan antibiotik tunggal sehingga memiliki jenis interaksi Antagonis.

Pada Tabel 1 menunjukkan uji kombinasi antara fraksi *E.scaber* dan Chloramphenicol. Pada fraksi 27, 28, 29, 30, 31, dan 32 didapatkan hasil berbeda signifikan ($p>0,05$) pada uji statistik Mann-Whitney Test . 6 fraksi *E.scaber* yang diuji dengan Chloramphenicol pada bakteri *E.coli* memiliki hasil pada Fraksi 27 dan fraksi 28 signifikan ($p>0,05$) dengan hasil kombinasi lebih kecil dibandingkan dengan herbal tunggal dan antibiotik tunggal sehingga memiliki jenis interaksi Antagonis sedangkan pada fraksi 29,30,31,32 di dapatkan hasil tidak signifikan sehingga memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.



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

Keterangan. A. Fraksi 27 ekstrak metanolik *E.scaber*, F27F27= Fraksi 27 dosis 30 μ l, F27= Fraksi 27 dosis 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, F27A= Kombinasi fraksi 27 dan Amoxicilin, F27C= Kombinasi fraksi 27 dan Chloramphenicol; B. Fraksi 28 ekstrak metanolik *E.scaber*; C. Fraksi 29 ekstrak metanolik *E.scaber*; D. Fraksi 30 ekstrak metanolik *E.scaber*; E. Fraksi 31 ekstrak metanolik *E.scaber*; F. Fraksi 32 ekstrak metanolik *E.scaber*.



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

Keterangan A. Fraksi 27 ekstrak metanolik *E.scaber* , F27F27= Fraksi 27 dosis 30µl, F27= Fraksi 27 dosis 15µl, AA= Amoxicilin dosis 30µl, A= Amoxicilin dosis 15µl, CC= Chloramphenicol dosis 30µl, C= Chloramphenicol dosis 15µl, F27A= Kombinasi fraksi 27 dan Amoxicilin, F27C= Kombinasi fraksi 27 dan Chloramphenicol ; B. Fraksi 28 ekstrak metanolik *E.scaber*; C. Fraksi 29 ekstrak metanolik *E.scaber* ; D. Fraksi 30 ekstrak metanolik *E.scaber* ; E. Fraksi 31 ekstrak metanolik *E.scaber* ; F. Fraksi 32 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		CHL		AMX		CHL	
		Rerata± SD (mm)	JI	Rerata± SD (mm)	JI	Rerata± SD (mm)	JI	Rerata± SD (mm)	JI
27	F27	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	A	0,0±0,0		13,0±1,7		0,0±0,0		8,6±8,6	
	F27A	0,0±0,0	ND	13,0±1,7	ND	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ANT
	F27F27	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	AA	0,0±0,0		15,6±3,0		0,0±0,0		9,3±0,6	
28	F28	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	A	9,0±1,0		12,6±1,5		0,0±0,0		9,0±0,0	
	F28A	9,0±1,0	ND	12,6±2,0	ND	0,0±0,0	ND	0,0±0,0	ANT
	F28F28	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	AA	9,6±0,6		13,3±2,0		0,0±0,0		9,0±0,0	
29	F29	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	A	00,0±6,6		14,3±1,5		4,6±8,0		14,6±0,6	
	F29A	9,6±9,6	ND	14,6±2,0	ND	0,0±0,0	ND	14,3±2,0	ND
	F29F29	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	AA	10,3±10,3		16,0±2,0		0,0±0,0		18,6±2,0	
30	F30	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	A	0,0±0,0		13,6±3,0		0,0±0,0		15,0±1,0	
	F30A	0,0±0,0	ND	10,3±1,1	ANT	0,0±0,0	ND	15,0±1,0	ND
	F30F30	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	AA	7,6±0,6		16,6±2,3		0,0±0,0		19,0±3,6	
31	F31	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	A	8,0±8,0		12,6±0,6		0,0±0,0		13,0±1,0	
	F31A	9,6±9,6	ND	13,6±2,3	ND	0,0±0,0	ND	12,6±1,5	ND
	F31F31	5,0±5,0		5,0±4,3		0,0±0,0		0,0±0,0	
	AA	9,6±9,6		16,0±1,0		0,0±0,0		16,3±3,0	
32	F32	0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0		0,0±0,0	
	A	9,3±0,6		13,6±1,5		2,6±4,6		16,0±0,0	
	F32A	6,0±5,1	ND	15,0±1,0	ND	0,0±0,0	ND	14,3±2,0	ND
	F32F32	5,3±5,3		5,3±4,6		0,0±0,0		0,0±0,0	

Analisa Uji Screening Fitokimia

Hasil dari uji screening fitokimia yang dilakukan pada F27-F32 menunjukkan adanya senyawa aktif di dalamnya, meskipun pada beberapa fraksi yang diuji tidak ditemukan spot dan perubahan warna pada uji screening fitokimia. Pada uji screening fitokimia yang menggunakan reagen Dragendorff didapatkan hasil positif (+) jika didapatkan perubahan warna menjadi warna orange menandakan adanya kandungan alkaloid di dalamnya¹³.

Pada uji reagen formaldehyde yang didapatkan perubahan warna menjadi warna coklat menandakan adanya kandungan steroid di

PEMBAHASAN

Analisa Uji Screening Fitokimia

Hasil dari uji screening fitokimia yang dilakukan pada F27-F32 menunjukkan adanya senyawa aktif di dalamnya, meskipun pada beberapa fraksi yang diuji tidak ditemukan spot dan perubahan warna pada uji screening fitokimia. Pada uji screening fitokimia yang menggunakan reagen Dragendorff didapatkan hasil positif (+) jika didapatkan perubahan warna menjadi warna orange menandakan adanya kandungan alkaloid di dalamnya¹³.

Pada uji reagen formaldehyde yang didapatkan perubahan warna menjadi warna coklat menandakan adanya kandungan steroid di dalamnya (Jork et al, 1994). Pada uji screening fitokimia yang menggunakan reagen $FeCl_3$ yang didapatkan perubahan warna menjadi biru kehitaman menandakan adanya kandungan Fenol¹³.

Pada F27 yang diuji dengan Dragendorff, $FeCl_3$ dan formaldehyde mendapatkan hasil positif (+) yang sama perubahan warna oranye, biru kehitaman dan kuning kecoklatan. Namun, pada F28 dan F30 diuji dengan Dragendorff, $FeCl_3$ dan formaldehyde mendapatkan hasil positif (+) yang sama perubahan warna oranye dan biru kehitaman. Pewarnaan dengan formaldehyde F28 tidak didapatkan perubahan warna.

Selain itu, pada F29 dan F31 didapatkan hasil positif (+) perubahan warna oranye pada pewarnaan Dragendorff dan biru kehitaman pada pewarnaan $FeCl_3$. Namun, pada F32 hasil positif (+) hanya pada pewarnaan Dragendorff berwarna oranye.

Hasil yang didapatkan pada uji fitokimia, didapatkan kandungan senyawa seperti flavonoid, steroid dan fenol. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan pelarut metanol dan etil asetat didapatkan kandungan senyawa alkaloid, steroid dan fenol. screening uji fitokimia yang dilakukan didapatkan hasil positif (+) terdapat senyawa alkaloid, steroid dan fenol dalam tumbuhan herbal *E.scaber*¹⁴.

Pada hasil penelitian uji KLT spray didapatkan spot pada F27-32 *E.scaber*, yang diduga

mengandung senyawa aktif. Spot yang didapatkan pada KLT mengalami tailing sehingga dapat menyebabkan proses identifikasi menjadi lebih sulit. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya yakni kurang tepatnya pemilihan fasa gerak sehingga chamber menjadi kurang jenuh, dosis fraksi yang ditotolkan terlalu pekat sehingga menyebabkan tailing, dan juga panjang jarak elusi yang kurang tepat atau terlalu pendek sehingga proses elusi tidak sempurna¹⁵.

Analisa ZOI Kombinasi pada Antibiotik Amoxicilin dan Chloramphenicol terhadap Bakteri *S. aureus* dan *E.coli*

Pada penelitian ini dilakukan uji zona hambat menggunakan metode difusi sumuran yang hasilnya Dari hasil penelitian Uji ZOI tunggal antibiotik Amoxicilin dan Chloramphenicol didapatkan hasil bahwa zona inhibisi pada Amoxicilin dan Chloramphenicol terhadap bakteri *S.aureus* lebih kuat dari pada terhadap bakteri *E.coli*. Amoxicillin berkerja dengan cara menghambat PBP pada dinding sel bakteri sehingga tidak terjadi sintesis peptidoglikan dan lisis. Chloramphenicol bekerja dengan cara berikatan dengan protein 50S sehingga menghambat proses peptidyl transferase¹⁶. Hambatan pada proses ini menyebabkan penurunan pertumbuhan pada bakteri. Selain perbedaan mekanisme kerja antibiotik, struktur bakteri juga mempengaruhi efektifitas antibiotik¹⁷.

Amoxicilin memiliki efek antibiotik yang lebih sensitif terhadap *S.aureus* dan *E.coli* dibandingkan Chloramphenicol. Hasil tersebut dikarenakan perbedaan mekanisme dari antibiotik terhadap *E.coli* dan *S. aureus*, dimana perbedaan struktur dari dinding sel bakteri juga mempengaruhi hasil dari uji ZOI tunggal antibiotik. Pada penelitian ini bakteri gram positif menggunakan *S.aureus* dan bakteri gram negatif menggunakan *E.coli*. Struktur dinding sel bakteri gram positif lebih sederhana dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Pada gram positif struktur dinding selnya terdiri atas asam teikoat, peptidoglikan dan memiliki tiga komponen membran luar yaitu lipoprotein, lipopolisakarida dan membran periplasma. Hal ini menyebabkan bakteri gram positif lebih mudah dihambat pertumbuhannya daripada bakteri gram negatif¹⁸.

Penelitian lain menyebutkan bahwa efek antagonis dari kombinasi antibiotik dan herbal dapat disebabkan oleh mekanisme reactive oxygen species (ROS) dan antioksidan¹⁹. Antibiotik chloramphenicol dapat menginduksi hiperaktivasi transport elektron dan membentuk ion super radikal. Ion radikal tersebut merusak DNA, lipid, dan protein sehingga terjadi kematian bakteri. Hal yang sebaliknya, terjadi pada saat herbal menginduksi bakteri. Herbal memiliki senyawa antioksidan yang dapat menetralkan ROS yang dikeluarkan oleh antibiotik. Tiga kelas antibiotik antibakterisidal seperti quinolon, aminoglikosida, dan beta-laktam dapat meningkatkan Reactive

Oxygen spesies (ROS)²⁰. Amoxicillin sebagai antibiotik golongan beta-lactam dapat meningkatkan ROS. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 90% dan 100% menunjukkan bahwa EGCG dapat menghambat pertumbuhan bakteri²¹. Hal ini membuktikan bahwa kandungan EGCG dalam teh hijau memiliki efek antibiotik yang Kombinasi fraksi 27 dan 28 tapak liman dan Chloramphenicol bersifat antagonis dalam membunuh *E.coli*. Hal yang berbeda ditemukan pada kombinasi fraksi 29-32 tapak liman dan Chloramphenicol yang bersifat not distinguishable dalam membunuh *E.coli*. Faksi 27 dan 28 mengandung senyawa steroid, fenol, dan alkaloid sedangkan 29-32 mengandung hanya senyawa fenol dan alkaloid. Senyawa steroid yang terkandung dalam ekstrak methanol dari *E.scaber* adalah 25-Hydroxy-24-methylcholesterol, sedangkan senyawa sterol dari *E. scaber* adalah urs-12-ene-3 β -heptadecaoate, stigmasterol, stigmasterol-3-O- β -D-glucoside, β -sistosterol, daucosterol, dan 28Nor-22(R)Witha,2,6,23-trienolide²³. Pada beberapa senyawa tersebut β -sistosterol, stigmasterol adalah senyawa yang memiliki efek antibakteri²⁴. Senyawa β -sistosterol memiliki mekanisme kerja dalam membunuh bakteri dengan cara membrane disruptions²⁴. Mekanisme membrane disruptors diawali dengan adanya interaksi antara senyawa aktif dengan membran lipid dan protein sel. Interaksi ini menyebabkan perubahan morfologi pada dinding sel bakteri sehingga terjadi kebocoran dari intraseluler²⁵.

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 sel.

Namun hal berbeda terdapat pada kombinasi *E.scaber* dengan amoxicillin terhadap *E.coli* dan *S.aureus*. Tidak didapatkan hasil mekanisme bakteriostatik 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 amoxicillin²².

Tingkat stabilitas kerja amoxicillin mengalami penurunan lebih tinggi 50% pada suhu kamar (27° C -29° C). Pada suhu kulkas (4° C -8° C) tingkat degradasi kadar amoxicillin lebih rendah yaitu sebesar 10%²².

Penelitian oleh Kumar, dkk tahun 2004 menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun Tapak liman memiliki efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Proteus*

bekerja langsung dengan cara merusak membran sel bakteri, menghambat sintesis asam lemak dan menghambat aktivitas enzim pada bakteri. Pada Tapak Liman tidak ditemukan adanya EGCG, namun tidak menutup kemungkinan adanya senyawa yang mirip atau bahkan memiliki efek yang sama dengan senyawa yang terkandung dalam tapak liman²².

*vulgaris*²⁶. Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa terpenoid ekstrak asetonnya dapat membunuh *S.aureus*²⁶. Penelitian lain oleh Anita, dkk menunjukkan bahwa ekstrak acetone, chloroform, dan etanol membunuh *S.aureus* dan ekstrak benzenanya dapat membunuh *E.coli*²⁷.

Kombinasi Amoxicillin dan Chloramphenicol dengan herbal menghasilkan efek sinergis. Kombinasi Amoxicillin dengan herbal *Mallotus oppositifolius*, *Bidens pilosa*, *Morinda lucida*, *Croton membranaceus* dan *Jatropha curcas* menghasilkan efek sinergis dalam membunuh *S.aureus*²⁸. Selain itu, kombinasi Amoxicillin dengan ekstrak *Spathodia campanulata*, *M.lucida*, *M. oleifera* dan *J. curcas* bersifat sinergis dalam membunuh *E.coli*²⁸. Penelitian lain juga menyatakan bahwa Amoxicillin dan Chloramphenicol bersifat sinergis dalam membunuh *E.coli* dan *S.aureus* ketika dikombinasikan dengan ekstrak metanol *Acacia mearnsii* dan ekstrak etil asetat *Melissa officinalis*²⁹.

KESIMPULAN

Efek antagonis ditemukan pada kombinasi chloramphenicol dengan F30 terhadap *S.aureus* dan dengan F27-F28 terhadap *E.coli*. Fraksi F27-F31 *E.scaber* mengandung alkaloid dan fenol serta F27 juga terdapat senyawa steroid.

Penelitian lanjutan tentang mekanisme antibakteri fraksi *E.scaber* dalam membunuh bakteri perlu dilakukan.

UCAPAN TERIMAKASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementrian Kesehatan RI. Pedoman Penggunaan Antibiotik. Jakarta : Departemen Kesehatan RI (2011).
2. Baorto, P.E. *Staphylococcus aureus* Infection. <https://emedicine.medscape.com/> (2017).
3. Madappa, T. *Escherichia coli* Infection. <https://emedicine.medscape.com/> (2018)
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia (DEPKES RI). Integrasi Pengobatan Tradisional Dalam Sistem Kesehatan Nasional. <https://www.depkes.go.id> (2011)
5. Nathawani, D., Morgan, M., Robert, G., Masterton., Dryden, M., Barry, D., Cookson., French, G. and Lewis. D. Guidelines for UK Practice for The

- Diagnosis and Management of Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections Presenting in The Community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (1) : 976-994 (2008).
6. UNICEF. Amoxicilin Dispersible Tablets (DT) : Product Profile Availability and Guidance (2013).
 7. Kohler PK, Chung MH, McGrath CJ, Benki-Nugent SF, Thiga JW, JohnStewart GC. Implementation of Free Cotrimoxazole Prophylaxis Improves Clinic Retention Among Antiretroviraltherapy-ineligible Clients in Kenya. *AIDS*;25 (13): 1657-1661 (2011).
 8. Refdanita. Pola Kepekaan Kuman terhadap Antibiotik di ruang Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002. *Makara Kesehat.* 8, 41–48 (2004)
 9. Jasmine, R., Servakumar, B. . & Daisy. Saponins from *Eugenia jambolane* with Antibacterial Activity Against Beta-Lactamase Producing Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Res. J. Med. Plant* 1, 1–6 (2007)
 10. Aiyegoro, A. O., Afolayan, A. J. & Okoh, A. I. In Vitro Antibacterial Activities of Crude Extracts of The Leaves of *Helichrysum longifolium* In Combination with Selected Antibiotics. *African J. Pharm. Pharmacol.* 3, 293–300 (2009)
 11. Yaumi, V., Risadiansyah, R. & Faisal. Efek Kombinasi Tapak Liman (*Elephantopus scaber* L.) dengan Antibiotik Amoxicilin, Chloramphenicol, dan Cotrimoxazol terhadap Daya Pertumbuhan Bakteri *S. aureus* dan *E.coli* Secara In Vitro. (2018).
 12. Ziaei-darounkalaei, N. & Ameri, M. AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. *MethodsX* 3, 43–52 (2016)
 13. Jork.H, W. Funk, W. Fishcer, dan H. Wimmer, Wiley, NY. TLC Reagents dan Detection Methods - Physical & Chemical Detection Methods: Activation Reactions, Reagent Sequences, Reagents, 2 (1994).
 14. Rumouw D,. Identifikasi dan Analisis Kandungan Fitokimia Tumbuhan Alam Berkhasiat Obat yang Dimanfaatkan Masyarakat Sekitar Kawasan Hutan Lindung Sahedaruman. *J LPPM Bidang Sains dan Teknologi.* ; 4(2):53-66 (2017)
 15. Olajuyigbe, O. O. & Afolayan, A. J. Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild . with Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8915–8932 (2012).
 16. Katzung, B. G., Masters, S. B. & Trevor, A. B. *Katzung - Basic and Clinical Pharmacology 12th Edition* (2012). (Mc Graw Hill LANGE, 2012)
 17. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–16 (2010).
 18. Lesage G, Bussey H. 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Reviews.* 70(2): 317-343. doi: 10.1099/mic.0.26471-0
 19. Acker, H. Van & Coenye, T. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol.* 20, 1–11 (2016).
 20. Edilu, A., Adane, L. & Woyessa, D. In vitro antibacterial activities of compounds isolated from roots of *Caylusea abyssinica*. *Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 1–8 (2015).
 21. Kumar, S. S., Perumal, P. & Suresh, B. Antibacterial Studies on Leaf Extract of *Elephantopus scaber* Linn. *Anc. Sci. life vol* 23, 6–8 (2004)
 22. Adina, S. *Pengaruh Waktu Dan Temperatur Penyimpanan Terhadap Tingkat Degradasi Kadar Amoxicilin Dalam Sediaan Suspensi Amoksisilin- Asam Klavulanat.* (UIN Jakarta, 2014)
 23. Kabeer, F. A. & R. Prathapan. 2014. *Phytopharmacological Profile of Elephantopus saber.* *Pharmacologia*, 5: 272-285
 24. Ocampo, P. S., Arnoldini, M., Fekete, G., Ackermann, M. & Bonhoeffer, S. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4573–4582 (2014).
 25. Zeniusa, P. & Ramadhian, M. R. Efektifitas Ekstrak Etanol Teh Hijau dalam Menghambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Effectiveness of Green Tea Ethanol Extracts inhibiting *Escherichia coli* Growth. *Majority* 7, 26–30 (2017).
 26. Daisy, P., Mathew, S., Suveena, S. & Rayan, N. A. A Novel Terpenoid from *Elephantopus Scaber* – Antibacterial Activity on *Staphylococcus Aureus*: A Substantiate Computational Approach. *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 196–203 (2008).
 27. Anitha, V. T., Antonisamy, J. M. & Jeeva, S. Anti-bacterial studies on *Hemigraphis colorata* (Blume) H . G . Hallier and *Elephantopus scaber* L . *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 52–57 (2012).
 28. Gbedema, S. Y., Adu, F., Bayor, M. T., Annan, K. & Boateng, J. S. Enhancement of Antibacterial Activity of Amoxicillin by Some Ghanaian. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 1, 145–152 (2010)
 29. Stefanović, O. & Comic, L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2, 1–5 (2012).

