

**Efek Penambahan Fraksi Semi Polar (F1-F7) Ekstrak Metanolik *Phyllanthus niruri*, L. Terhadap Daya Hambat Amoxicillin atau Chloramphenicol pada *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli***

Wahyuni Dwi Permata Sari\*, Rio Risandiansyah\*\*, Hardadi Airlangga\*\*

\* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

\*\* Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**ABSTRAK**

**Pendahuluan:** Tingginya angka kejadian infeksi bakteri diterapi menggunakan antibiotik dapat meningkatkan risiko resistensi antibiotik. Untuk menanggulangi resistensi antibiotik dapat menggunakan kombinasi herbal seperti meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) dengan antibiotik oleh karena itu, kombinasi tersebut perlu didalami lebih lanjut untuk menjadi alternatif yang tepat dalam menurunkan angka resistensi. Namun, belum diketahui senyawa spesifik yang mempengaruhi aktivitas herbal pada kinerja antibiotik. Oleh sebab itu, perlu penelitian lebih lanjut tentang efek penambahan fraksi meniran pada antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

**Metode:** Fraksi 1-7 didapatkan dari proses fraksinasi ekstrak metanolik simplisia *Phyllanthus niruri*, L. menggunakan resin silica dengan eluen etil asetat 100%. 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. Uji statistik dilakukan dengan Mann-Whitney dengan signifikan  $p < 0,05$ .

**Hasil:** Fraksi dengan eluen etil asetat 100% menghasilkan 7 fraksi yaitu F1-F7. Fraksi F3 memiliki interaksi sinergis dengan *chloramphenicol* dalam membunuh *E.coli* dengan ZOI kombinasi  $11,3 \pm 0,57$  mm dan ZOI antibiotik tunggal  $11 \pm 0$  mm. Fraksi F6 memiliki interaksi sinergis dengan *amoxicillin* dalam membunuh *S.aureus* dengan ZOI kombinasi  $15,3 \pm 0,57$  mm dan ZOI antibiotik tunggal  $14 \pm 0$  mm. Sedangkan pada fraksi lain memiliki interaksi *not distinguishable*. Fraksi F5, F6 dan F7 memiliki senyawa fenol dengan jenis senyawa yang berbeda.

**Kesimpulan:** Fraksi F3 bersifat sinergis dengan *chloramphenicol* dalam membunuh *E. coli*. F6 bersifat sinergis dengan *amoxicillin* dalam membunuh *S.aureus*. Fraksi F1, F2, F4, F5 dan F7 memiliki interaksi *not distinguishable*. Fraksi F5, F6 dan F7 mengandung senyawa aktif fenol.

**Kata Kunci:** *Phyllanthus niruri*, L., *Amoxicillin*, *Chloramphenicol*, Uji Fitokimia, Zona Inhibisi, Kombinasi Antibiotik dan Herbal.

\*\*Korespondensi: [riorisandiansyah@unisma.ac.id](mailto:riorisandiansyah@unisma.ac.id)

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**The Effect Of Semi Polar Methanolic Fraction (F1-F7) *Phyllanthus niruri*, L. Extract On Inhibitory Effect Of Amoxicillin or Chloramphenicol On *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli***

Wahyuni Dwi Permata Sari\*, Rio Risandiansyah\*\*, Hardadi Airlangga\*\*

\*Student of the Faculty of Medicine the University of Islam Malang

\*\* Teaching Staff of the Faculty of Medicine the University of Islam Malang

**ABSTRACT**

**Introduction:** The high incidence of bacterial infections being treated using antibiotics can increase the risk of antibiotic resistance. To overcome antibiotic resistance, herbal combinations such as meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) can be used with antibiotics. Therefore, this combination needs to be explored further to be the right alternative in reducing resistance rates. However, it is not yet known which specific compounds affect the activity of herbs on antibiotic performance. Therefore, further research is needed on the effect of adding fraction meniran to antibiotics in inhibiting the growth of bacteria *S. aureus* and *E. coli*.

**Methods:** Fractions 1-7 were obtained from the fractionation process of methanolic simplex extract *Phyllanthus niruri*, L. using silica resin with 100% ethyl acetate eluent. Inhibition Zone Test (ZOI) uses the Kirby-Bauer method. The interaction effect is calculated based on the Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST) method. Phytochemical tests using Thin Layer Chromatography (TLC) with  $FeCl_3$  reagent, dragendorff, and formaldehyde. Statistical tests were performed with Mann-Whitney with a significant  $p < 0.05$ .

**Results:** The fraction with 100% ethyl acetate eluent produced 7 fractions, F1-F7. The F3 fraction has a synergistic interaction with *chloramphenicol* in killing *E.coli* with a combination ZOI of  $11.3 \pm 0.57$  mm and a single antibiotic ZOI of  $11 \pm 0$  mm. The F6 fraction has a synergistic interaction with *amoxicillin* in killing *S. aureus* with a combination ZOI of  $15.3 \pm 0.57$  mm and a single antibiotic ZOI of  $14 \pm 0$  mm. Whereas the other fractions have not distinguishable interactions. Fraction F5, F6 and F7 have phenol compounds with different types of compounds.

**Conclusion:** F3 fraction is synergistic with *chloramphenicol* in killing *E. coli*. F6 is synergistic with *amoxicillin* in killing *S. aureus*. The fractions F1, F2, F4, F5 and F7 have not distinguishable interactions. Fraction F5, F6 and F7 contain phenol active compounds.

**Keywords:** *Phyllanthus niruri*, L., *Amoxicillin*, *Chloramphenicol*, Phytochemical Test, Zone of Inhibition, Combination. Of Antibiotic and Herb.

Corresponding author: [riorisandiansyah@unisma.ac.id](mailto:riorisandiansyah@unisma.ac.id)

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi di Indonesia merupakan penyebab utama tingginya angka morbiditas dan angka mortalitas.<sup>1</sup> Penyebab infeksi bakteri tersering salah satunya *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.<sup>2</sup> Pengobatan infeksi yang paling umum dilakukan dengan menggunakan terapi antibiotik.<sup>3</sup> Antibiotik memiliki kegunaan untuk menekan dalam proses infeksi dari bakteri.<sup>4</sup> Penggunaan antibiotik memiliki konsekuensi timbulnya patogen yang dapat menimbulkan resisten terhadap antibiotik.<sup>4</sup>

Solusi lain untuk menanggulangi resistensi antibiotik adalah dengan melakukan kombinasi antibiotik menggunakan herbal yang memiliki manfaat aktivitas antibakteri, terapi ini akan memiliki manfaat untuk memperluas spektrum antibakteri, meminimalisir toksisitas.<sup>5</sup> Hasil yang diberikan pada pemberian kombinasi antibiotik dengan tanaman herbal dapat bersifat sinergis dan antagonis.<sup>5</sup> Interaksi dikatakan sinergis apabila meningkatkan kerja antibiotik, sedangkan interaksi dikatakan antagonis apabila menyebabkan penurunan efek dari antibiotik.<sup>5</sup> Kombinasi antibiotik juga dapat dilakukan dengan herbal yang masing-masing memiliki senyawa aktif untuk menggantikan peran obat sintetik sebagai kombinasi yang memiliki efek samping lebih sedikit dibandingkan dengan obat sintetik.<sup>6</sup>

Pada penelitian sebelumnya oleh Adelia et al (2018) mengenai kombinasi ekstrak kasar meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) dan *chloramphenicol* terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* mendapatkan hasil aditif yang menandakan tidak adanya interaksi antara herbal dengan antibiotik terhadap bakteri dalam meningkatkan maupun menurunkan daya hambat ataupun daya bunuh pada bakteri. Sedangkan pada uji yang sama ekstrak *Phyllanthus niruri*, L. dengan *amoxicillin* bersifat sinergis dalam menghambat dan membunuh bakteri *S. aureus* bersifat sinergis dan *E. coli* mendapatkan hasil antagonis.<sup>7</sup> Hasil yang berlawanan ini diduga karena senyawa yang didapatkan dari ekstrak herbal masih berupa senyawa campuran yang mempengaruhi interaksi dengan antibiotik terhadap bakteri.<sup>8</sup>

Ekstrak kasar *Phyllanthus niruri*, L. dapat mempengaruhi kerja *amoxicillin* dan *chloramphenicol*. Namun, belum diketahui senyawa spesifik yang terdapat dalam aktivitas herbal yang mempengaruhi kinerja antibiotik.<sup>9</sup>

Penelitian melakukan pemisahan kandungan senyawa aktif ekstrak *Phyllanthus niruri*, L. berdasarkan kepolarannya dengan metode fraksinasi, mengambil fraksi F1-F7 karena memiliki sifat semi polar untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan senyawa yang diekstraksi yang mempunyai kemampuan zat untuk menyebar pada berbagai media yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Kemudian fraksi-fraksi tersebut dikombinasi dengan *amoxicillin* atau *chloramphenicol* untuk mengetahui daya hambat

dan kombinasi dengan uji *Zone of Inhibition* (ZOI) terhadap bakteri *E. coli* atau *S. aureus*. Penelitian ini juga untuk mengetahui jenis senyawa aktif dari fraksi semi polar (F1-F7) ekstrak *Phyllanthus niruri*, L. melalui uji KLT dan uji fitokimia.

## METODE PENELITIAN

### Desain Penelitian

Rancangan penelitian ini dengan menggunakan cara *in vitro*, dilakukan untuk mengetahui efek dari kombinasi fraksi F1-F7 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L. dengan *amoxicillin* atau *chloramphenicol* terhadap perubahan diameter *Zone of Inhibition* (ZOI) pada bakteri *S. aureus* atau *E. coli*.

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari Januari hingga Mei 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Herbal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

### Pembuatan Ekstrak Metanolik *Phyllanthus niruri*, L.

Pembuatan ekstraksi *Phyllanthus niruri*, L. menggunakan metode maserasi yang dimodifikasi. Diawali dengan mempersiapkan simplisia *Phyllanthus niruri*, L. dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Simplisia herbal sebanyak 200 gram dicampurkan dengan metanol PA 96% sebanyak 2000 ml, dibagi rata kedalam 5 buah erlenmeyer ukuran 500 ml. Setiap erlenmeyer yang sudah tercampur 40 gram simplisia dan 400 ml metanol PA 96% ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 24 jam pada *shaker water bath* dengan kecepatan 4,5. Disaring menggunakan *vacuum* dengan corong *buchner* untuk memperoleh filtrat dan dilakukan evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 55°C hingga volume filtrat berkurang dan menjadi kental. Filtrat ditampung didalam gelas beaker dengan ukuran 250 ml dan disimpan dalam oven dengan suhu 40°C selama 3-5 hari. Filtrat diencerkan menggunakan metanol PA 96% dalam hitungan 100 mg/ml dan disimpan dalam kulkas.

### Metode Fraksinasi *Phyllanthus niruri*, L.

Fraksinasi dilakukan menggunakan kromatografi kolom berdiameter 2 cm dan panjang kolom 30 cm, dengan fasa diam (resin silica gel) dan fasa gerak yang terdiri dari pelarut polar hingga non polar (etil asetat dan metanol). Susunan pada fraksi yaitu pada bagian paling bawah diisi dengan kertas saring, dilanjutkan diisi *glass wool*, lalu  $\pm 2/3$  kolom diisi dengan silica, herbal 2 gr dengan silica 3 gr dicampurkan. Setelah tersusun, dimasukkan pelarut ke dalam kolom dengan urutan dan perbandingannya sebagai berikut : (1) 100 % etil asetat, (2) 90 etil

asetat : 10 metanol, (3) 75 etil asetat : 25 metanol, (4) 50 etil asetat : 50 metanol, (5) 25 etil asetat : 75 metanol, (6) 100% metanol. Fraksi 1-7 didapatkan dari pelarut etil asetat.

Hasil fraksi yang didapat ditampung pada tabung vial. Setelah terisi 10 ml, hasil fraksi dipindahkan ke dalam vial. Selain itu, mengganti setiap tabung reaksi jika terdapat perubahan warna pada tetesan yang keluar walaupun belum mencapai 10 ml atau sesuai dengan pergantian dari pelarut. Fraksi dalam vial ditimbang, dan dituang ke dalam eppendorf sebanyak 1 ml.

#### Pembuatan Larutan Antibiotik

Pembuatan larutan antibiotik dimulai dengan mempersiapkan kapsul *chloramphenicol* serbuk 1000 mg dan serbuk *amoxicillin* 1000 mg. Masing-masing antibiotik tersebut dilarutkan ke dalam 10 ml *aquadest* steril hingga didapatkan konsentrasi 100 mg/ml.

#### Kromatografi Lapis Tipis

Setelah fraksi didapatkan, dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menkonfirmasi hasil fraksi yang memiliki senyawa yang sama akan digabungkan kedalam satu fraksi. KLT menggunakan F<sub>254</sub> silica plate dengan pelarut 3 ml etil asetat : 7 ml metanol. Plat KLT yang telah diaktivasi (di dalam oven selama 15 menit dengan suhu 50°C) kemudian ditetesi dengan menggunakan *yellow tip* sebanyak 50-100 µl. Setelah kering, plat KLT dimasukkan kedalam chamber berisi eluen dan didiamkan, ditunggu hingga pelarut naik sampai batas garis atas pada plat. Plat dikeluarkan dan hasilnya diamati. Hasil nilai R<sub>f</sub> yaitu dengan membagi jarak tempuh zat (jarak noda) dengan jarak tempuh pelarut (jarak eluasi).

#### Uji Fitokimia *Phyllanthus niruri*, L.

Uji pertama skrining fitokimia yang dilakukan adalah menentukan kandungan alkaloid, dengan menggunakan reagen *dragendorff* yang disemprotkan pada KLT yang sudah ditotoli fraksi (F1-F7) ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L. kemudian diamati perubahan warnanya dan dicatat nilai R<sub>f</sub>. Jika terbentuk endapan keruh dan terjadi perubahan warna jingga – kecoklatan, menunjukkan sampel mengandung senyawa aktif alkaloid.<sup>10</sup>

Uji kandungan fenol dilakukan dengan menggunakan reagen *ferric chloride* (FeCl<sub>3</sub>) yang disemprotkan pada KLT yang sudah ditotoli fraksi (F1-F7) ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L. KLT yang sudah disemprot dipanaskan selama 10 menit kemudian diamati dan dicatat perubahan warnanya. Perubahan warna biru tua-kehitaman menunjukkan sampel mengandung senyawa aktif fenol.<sup>11</sup>

Deteksi kandungan steroid, alkaloid, saponin dan derivat *phenothiazine* dengan menggunakan reagen *formaldehyde* yang disemprotkan pada KLT yang telah ditotoli fraksi (F1-F7) ekstrak metanolik

*Phyllanthus niruri*, L. KLT didiamkan pada suhu ruang hingga kering, kemudian diamati dan dicatat perubahan warnanya. Hasil dikatakan mengandung senyawa aktif jika terjadi perubahan warna kecoklatan.<sup>12</sup>

#### Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode *Pour Plate*

Metode *Pour plate* dilakukan dengan cara mempersiapkan inokulum menggunakan spektrofotometer. Koloni isolat bakteri diambil menggunakan oshe steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl 0,9% steril 10 ml hingga warna berubah menjadi keruh. Larutan dilakukan homogenisasi menggunakan *vortex mixer*. Sampel bakteri diambil sebanyak 1 ml dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam kuvet dan dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi dicatat dan dilakukan pengenceran dengan target OD<sub>600</sub> nm adalah 0,2.

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

Pembuatan media agar dibuat sesuai dengan instruksi dari produsen media yaitu dengan perbandingan nutrient agar dan *aquadest* 20 g/L, dan disterilisasi menggunakan autoclave. Inokulum dimasukkan sebanyak 1% dari media (10 ml/1L media) kedalam media agar. Media dituang ke dalam cawan petri 90 mm sehingga mengisi setengah tinggi cawan (kira kira 20-25 ml pada cawan 90 mm).<sup>13</sup>

#### Zone of Inhibition (ZOI)

Uji ZOI dilakukan dengan metode sumuran pada media agar. Biakan agar dilubangi dengan *cork borer* diameter ± 6 mm sebanyak 10 lubang, dan diisi dengan fraksi aktif herbal tunggal, antibiotik tunggal, dan kombinasi keduanya.

Uji ZOI kombinasi herbal dan antibiotik dilakukan dengan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST) untuk menilai efek kombinasi keduanya. Sumuran media agar diisi menggunakan dosis yang sudah ditentukan. Jika ditemukan zona bening disekitar lubang menunjukkan bahwa terdapat zona hambat pada pertumbuhan bakteri Media agar diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. *Clear zone* yang terbentuk diukur menggunakan penggaris dengan satuan mm.<sup>14</sup>

#### Metode Penentuan Jenis Interaksi

Hasil ZOI diinterpretasikan menggunakan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). Hasil sinergis jika diameter zona bening pada kombinasi herbal dengan antibiotik (A+B) lebih besar daripada herbal tunggal (A) dan antibiotik tunggal (B), dan lebih kecil atau lebih besar dari kombinasi herbal (AA) dan atau kombinasi antibiotik (BB). Hasil antagonis jika didapatkan hasil A+B lebih kecil dari A ataupun B. dikatakan aditif jika A+B sama dengan AA atau BB.

Sedangkan jika salah satu A atau B didapatkan sama dengan 0, A+B lebih besar dari A dan B, dan lebih kecil atau lebih besar dari AA dan/atau BB maka dikatakan potensiasi.<sup>15</sup>

#### Analisa Data Statistik

Pembacaan hasil ZOI tunggal dan kombinasi dilakukan menggunakan mistar dengan tingkat ketelitian 1 mm dan dimasukkan pada *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) untuk mendapatkan rata-rata dan standar deviasi. Uji Statistik penelitian ini menggunakan uji non parametrik independent *Mann-Whitney Test*, untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara variabel ZOI tunggal dan ZOI kombinasi pada setiap fraksi aktif herbal yang diujikan. Hasil ZOI akan diinterpretasikan menggunakan metode AZDAST.<sup>15</sup>

### HASIL

#### Hasil Pengukuran ZOI Antibiotik Tunggal Amoxicillin atau Chloramphenicol terhadap *S. aureus* atau *E. coli*

Pengukuran ZOI dilakukan dengan mengukur diameter zone bening (*clear zone*) yang terbentuk disekitar sumuran yang menandakan bahwa terdapat hambatan pertumbuhan bakteri pada perlakuan tersebut. Penghitungan diameter pada sumuran tersebut menggunakan penggaris millimeter. Semakin besar hambatan, maka semakin besar diameter zona bening yang terbentuk. Pada penelitian ini, dilakukan perbandingan diameter antara antibiotik tunggal, herbal tunggal dan kombinasi antibiotik dengan herbal.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wardati (2019) didapatkan zona bening pada antibiotik *amoxicillin* pada dilusi ke-1 dengan konsentrasi 100 mg/ml didapatkan hasil ZOI berdiameter  $21,3 \pm 1,15$  mm dan pada antibiotik *chloramphenicol* berdiameter  $15,3 \pm 2,0$  mm terhadap bakteri *S. aureus*. *Amoxicillin* memiliki ZOI lebih besar dibandingkan dengan *chloramphenicol* pada bakteri *S. aureus*.<sup>16</sup>

Sedangkan pada bakteri *E. coli*, antibiotik *amoxicillin* dengan konsentrasi 10 mg/ml diperoleh ZOI dengan diameter  $11,2 \pm 6,10$  mm dan antibiotik *chloramphenicol* berdiameter  $14 \pm 1$  mm, menandakan *chloramphenicol* memiliki ZOI lebih besar daripada *amoxicillin* pada bakteri *E. coli*.<sup>16</sup>

#### Hasil Uji ZOI Secara Tunggal pada Pengujian Fraksi (F1-F7) *Phyllanthus niruri*, L. terhadap *S. aureus*

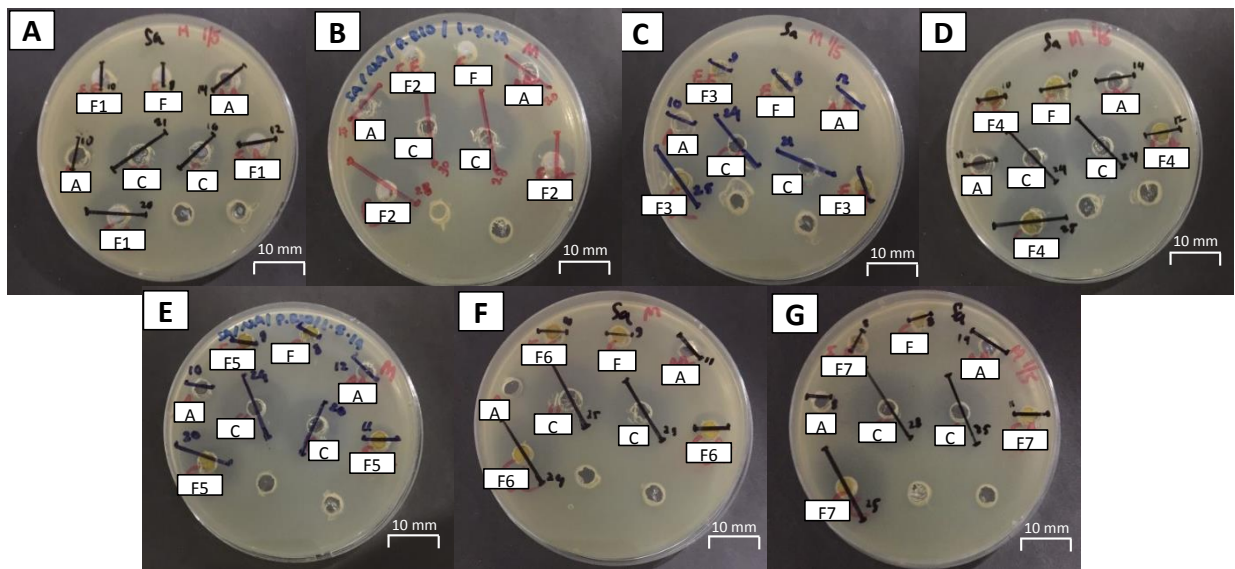
Berdasarkan Gambar 1 dan Tabel 1 maka dapat disimpulkan bahwa pada pengujian tunggal fraksi herbal *Phyllanthus niruri*, L. dengan dosis 15 µl (Fx) pada bakteri *S. aureus* fraksi 1, 3, 4, 5, 6 dan 7 memiliki zona inhibisi terhadap bakteri *S. aureus*. Aktivitas yang paling tinggi terdapat pada fraksi F6 dengan ZOI  $8 \pm 1$  dan aktivitas paling rendah terdapat pada fraksi F2 dengan ZOI  $0 \pm 0$ .

Pada pengujian tunggal fraksi herbal *Phyllanthus niruri*, L. dengan dosis 30 µl (FxFx) aktivitas paling tinggi terdapat pada F4F4 dengan ZOI  $10,3 \pm 0,57$  dan yang memiliki aktivitas paling rendah pada F2F2 dengan ZOI  $0 \pm 0$ .

#### Hasil Uji ZOI Kombinasi antara Herbal *Phyllanthus niruri*, L. dengan Antibiotik Amoxicillin atau Chloramphenicol terhadap *S. aureus*

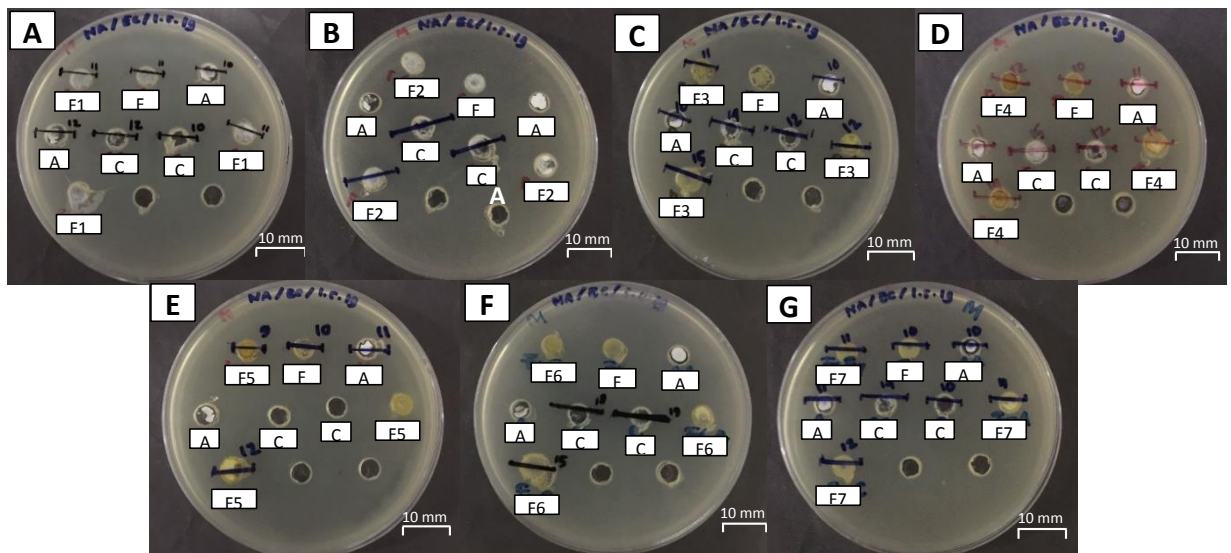
Berdasarkan Gambar 1 dan Tabel 1 pengujian kombinasi antara fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dengan antibiotik *amoxicillin* didapatkan hasil bahwa fraksi F1-F5 dan F7 tidak signifikan yaitu  $p > 0,05$  setelah dilakukan uji statistik non parametrik *Mann-Whitney Test*, sehingga fraksi F1-F5 dan F7 memiliki interaksi *not distinguishable*.

Pada pengujian kombinasi dengan antibiotik *chloramphenicol* fraksi F1-F7 di dapatkan hasil yang tidak signifikan yaitu  $p > 0,05$  setelah dilakukan uji statistik non parametrik *Mann-Whitney*, dan semua interaksi pada fraksi F1-F7 adalah *not distinguishable*.



**Gambar 1. Hasil ZOI Tunggal dan Kombinasi Fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dan Antibiotik pada Bakteri *S. aureus***

**Keterangan:** A. Fraksi 1 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L., F1F1= Fraksi 1 dosis 30  $\mu$ l, F1= Fraksi 1 dosis 15  $\mu$ l, AA= Amoxicillin dosis 30  $\mu$ l, A= Amoxicillin dosis 15  $\mu$ l, CC= Chloramphenicol dosis 30  $\mu$ l, C = Chloramphenicol dosis 15  $\mu$ l, F1A= Kombinasi fraksi 1 dan Amoxicillin, F1C= Kombinasi fraksi 1 dan Chloramphenicol; B. Fraksi 2 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; C. Fraksi 3 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; D. Fraksi 4 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; E. Fraksi 5 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; F. Fraksi 6 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; G. Fraksi 7 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.



**Gambar 2. Hasil ZOI Tunggal dan Kombinasi Fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dan Antibiotik pada Bakteri *E. coli***

**Keterangan:** A. Fraksi 1 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L., F1F1= Fraksi 1 dosis 30  $\mu$ l, F1= Fraksi 1 dosis 15  $\mu$ l, AA= Amoxicillin dosis 30  $\mu$ l, A= Amoxicillin dosis 15  $\mu$ l, CC = Chloramphenicol dosis 30  $\mu$ l, C = Chloramphenicol 1 dosis 15  $\mu$ l, F1A= Kombinasi fraksi 1 dan Amoxicillin, F1C= Kombinasi fraksi 1 dan Chloramphenicol; B. Fraksi 2 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; C. Fraksi 3 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; D. Fraksi 4 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; E. Fraksi 5 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; F. Fraksi 6 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.; G. Fraksi 7 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L.

**Tabel 1. Rerata dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi pada Pengujian Bersama antara Kombinasi Fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dengan Amoxicillin atau Chloramphenicol terhadap *S. aureus* atau *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 |
| 1          | F1F1   | 10,3 ± 0,57      |    | 10,3 ± 0,57     |    | 10,3 ± 0,57     |    | 10,6 ± 0,57     |    |
|            | F1     | 9 ± 0            |    | 9 ± 0           |    | 11 ± 1          |    | 11 ± 1          |    |
|            | AA     | 9 ± 7,8          | ND | 22,6 ± 2,0      | ND | 10,3 ± 0,57     | ND | 11,3 ± 1,1      | ND |
|            | A      | 6,6 ± 5,7        |    | 20,3 ± 1,5      |    | 11 ± 1          |    | 10,3 ± 2,5      |    |
|            | F1A    | 8 ± 6,9          |    | 20,6 ± 0,57     |    | 11,6 ± 2,0      |    | 8 ± 7           |    |
| 2          | F2F2   | 0 ± 0            |    | 0 ± 0           |    | 0 ± 0           |    | 0 ± 0           |    |
|            | F2     | 0 ± 0            |    | 0 ± 0           |    | 0 ± 0           |    | 0 ± 0           |    |
|            | AA     | 15,6 ± 3,7       | ND | 26 ± 3,6        | ND | 0 ± 0           | ND | 10,6 ± 9,4      | ND |
|            | A      | 12,3 ± 4,0       |    | 24 ± 4          |    | 0 ± 0           |    | 9,3 ± 8,0       |    |
|            | F2A    | 13 ± 4,3         |    | 23,6 ± 3,7      |    | 0 ± 0           |    | 8,6 ± 8,0       |    |
| 3          | F3F3   | 8,3 ± 0,57       |    | 8,3 ± 0,57      |    | 11,6 ± 0,57     |    | 11,6 ± 0,57     |    |
|            | F3     | 7,3 ± 0,57       |    | 7,3 ± 0,57      |    | 7,3 ± 6,3       |    | 7,3 ± 6,3       |    |
|            | AA     | 13 ± 1,7         | ND | 23,3 ± 0,57     | ND | 10,6 ± 1,1      | ND | 14 ± 0          | S  |
|            | A      | 10,6 ± 1,1       |    | 19,6 ± 2,3      |    | 10,6 ± 1,1      |    | 11,6 ± 0,57     |    |
|            | F3A    | 13 ± 2,6         |    | 22,3 ± 2,3      |    | 11,6 ± 0,57     |    | 15,3 ± 0,57     |    |
| 4          | F4F4   | 10,3 ± 0,57      |    | 10,3 ± 0,57     |    | 12,6 ± 2,0      |    | 12,6 ± 2,0      |    |
|            | F4     | 9,6 ± 0,57       |    | 9,6 ± 0,57      |    | 11,3 ± 2,3      |    | 11,3 ± 2,3      |    |
|            | AA     | 12,3 ± 2,0       | ND | 24,3 ± 1,5      | ND | 10,6 ± 0,57     | ND | 13,3 ± 1,5      | ND |
|            | A      | 10 ± 1           |    | 21,3 ± 2,3      |    | 12 ± 1          |    | 11,6 ± 0,57     |    |
|            | F4A    | 11,3 ± 1,1       |    | 20,6 ± 4,0      |    | 8 ± 6,9         |    | 13 ± 1,7        |    |
| 5          | F5F5   | 9,3 ± 0,57       |    | 9,3 ± 0,57      |    | 9,6 ± 0,57      |    | 9,6 ± 0,57      |    |
|            | F5     | 8,3 ± 0,57       |    | 8,3 ± 0,57      |    | 10 ± 0          |    | 10 ± 0          |    |
|            | AA     | 11,6 ± 0,57      | ND | 24,6 ± 0,57     | ND | 10,6 ± 0,57     | ND | 11 ± 9,5        | ND |
|            | A      | 10 ± 0           |    | 22,3 ± 2,0      |    | 6,6 ± 5,7       |    | 9,3 ± 8,1       |    |
|            | F5A    | 11 ± 1           |    | 21,3 ± 4,1      |    | 3,3 ± 5,7       |    | 14,6 ± 2,5      |    |
| 6          | F6F6   | 8,3 ± 0,57       |    | 9 ± 1           |    | 0 ± 0           |    | 0 ± 0           |    |
|            | F6     | 8 ± 1            |    | 8 ± 1           |    | 0 ± 0           |    | 0 ± 0           |    |
|            | AA     | 11 ± 0           | S  | 24 ± 1          | ND | 0 ± 0           | ND | 15,3 ± 4,6      | ND |
|            | A      | 8 ± 1            |    | 22 ± 1,7        |    | 0 ± 0           |    | 18,3 ± 0,57     |    |
|            | F6A    | 11,3 ± 0,57      |    | 21,6 ± 2,0      |    | 0 ± 0           |    | 16,6 ± 1,5      |    |
| 7          | F7F7   | 8 ± 0            |    | 8 ± 0           |    | 10,6 ± 0,57     |    | 10,6 ± 0,57     |    |
|            | F7     | 8 ± 1            |    | 8 ± 1           |    | 10 ± 0          |    | 10 ± 0          |    |
|            | AA     | 12,3 ± 2,0       | ND | 23,3 ± 4,1      | ND | 11 ± 1          | ND | 15 ± 1          | ND |
|            | A      | 9 ± 1,7          |    | 23,3 ± 1,5      |    | 7,6 ± 6,6       |    | 12 ± 2          |    |
|            | F7A    | 10,6 ± 1,5       |    | 23 ± 2          |    | 11,3 ± 0,57     |    | 11,3 ± 0,57     |    |

**Keterangan:** JI= Jenis interaksi; Fx= fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dosis 15 µl; A= antibiotik dosis 15 µl; FxA= uji ZOI kombinasi fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dan Antibiotik; FxFx= fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dosis 30 µl; AA= Antibiotik dosis 30 µl; AMX, Amoxicillin, CHL, Chloramphenicol, ND, Not Distinguishable; S, Sinergis.



### Hasil Uji ZOI Secara Tunggal pada Pengujian Fraksi (F1-F7) *Phyllanthus niruri*, L. terhadap *E. coli*

Berdasarkan Gambar 2 (Tabel 1) pengujian tunggal fraksi herbal *Phyllanthus niruri*, L. dengan dosis 15  $\mu$ l (Fx) dan 30  $\mu$ l (FxFx) pada bakteri *E. coli* fraksi 1, 3, 4, 5, dan 7 memiliki ZOI. Fraksi yang memiliki ZOI tertinggi yaitu pada F4 dosis 15  $\mu$ l (Fx) dengan ZOI  $11,3 \pm 2,3$  untuk dosis 30  $\mu$ l (FxFx) dengan ZOI  $12,6 \pm 2,0$ . Sedangkan, pada pengujian fraksi herbal *Phyllanthus niruri*, L. tunggal dengan dosis 15  $\mu$ l (Fx) dan 30  $\mu$ l (FxFx) hanya fraksi F2 dan F6 yang tidak memiliki ZOI dengan hasil  $0 \pm 0$ .

### Hasil Uji ZOI Kombinasi antara Herbal *Phyllanthus niruri*, L. dengan Antibiotik Amoxicillin atau Chloramphenicol terhadap *E. coli*

Berdasarkan (Tabel 1) kombinasi antara herbal *Phyllanthus niruri*, L. dengan antibiotik amoxicillin pada bakteri *E. coli* fraksi F1-F7 didapatkan hasil yang tidak signifikan yaitu  $p > 0,05$  setelah diukur dengan uji statistik non parametrik Mann-Whitney Test dan didapatkan jenis interaksi *not distinguishable*.

Sama halnya pada (Tabel 1) dengan uji kombinasi antara fraksi *Phyllanthus niruri*, L. dengan antibiotik chloramphenicol, fraksi F1, F2 dan F4-F7 didapatkan hasil yang tidak signifikan yaitu  $p > 0,05$  setelah dilakukan uji statistik Mann-Whitney Test, dan didapatkan jenis interaksi *not distinguishable*. Sedangkan pada fraksi F3 didapatkan hasil yang signifikan yaitu  $p < 0,05$  setelah dilakukan uji statistik Mann-Whitney Test, dan didapatkan jenis interaksi sinergis.

### Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui berbagai kandungan senyawa yang terdapat dalam tanaman yang berkaitan dengan struktur kimia dalam *Phyllanthus niruri*, L. menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang sudah ditetaskan fraksi *Phyllanthus niruri*, L. F1-F7 yang akan disemprotkan

dengan reagen yang telah ditentukan. Pada penelitian ini, reagen yang digunakan adalah dragendorff, formaldehyde, dan  $FeCl_3$  dimana hasilnya dianggap positif jika terjadi perubahan warna. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Gambar 3 dan (Tabel 2).

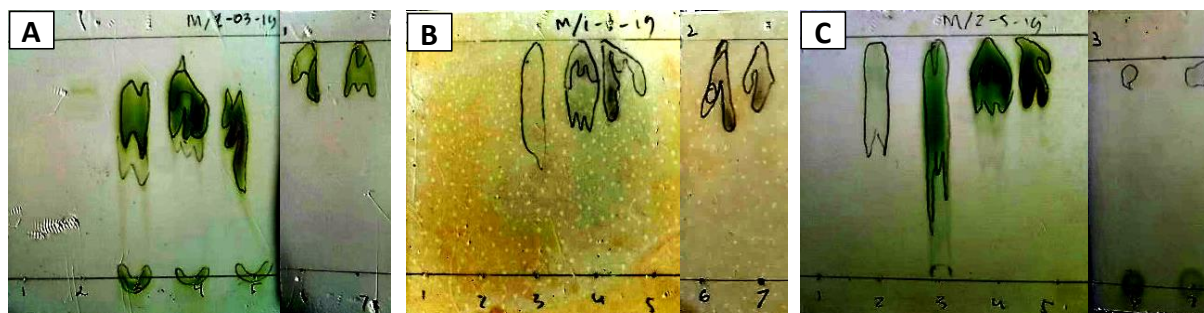
**Tabel 2. Hasil Perhitungan Rf pada KLT F1-F7**

| No.Fraksi | Reagent (Senyawa Aktif) |            |                            |
|-----------|-------------------------|------------|----------------------------|
|           | Alkaloid (Rf)           | Fenol (Rf) | Steroid dan Terpenoid (Rf) |
| F1        | -                       | -          | -                          |
| F2        | -                       | -          | -                          |
| F3        | -                       | -          | -                          |
| F4        | -                       | -          | -                          |
| F5        | -                       | +(0,84)    | -                          |
| F6        | -                       | +(0,84)    | -                          |
| F7        | -                       | +(0,97)    | -                          |

**Keterangan** Hasil penyemprotan dengan reagen Dragendorff,  $FeCl_3$  dan Formaldehyde pada fraksi F1-F7 ekstrak *Phyllanthus niruri*, L. Rf = Jarak tempuh substansi/Jarak tempuh pelarut (3,8 cm).

Pada Gambar 3 dan (Tabel 2) dengan uji reagen  $FeCl_3$  menunjukkan bahwa pada fraksi F5, F6, dan F7 didapatkan perubahan warna menjadi biru kehitaman yang positif menandakan pada fraksi tersebut mengandung fenol. Pada uji reagen lainnya yaitu reagen dragendorff dan formaldehyde tidak menunjukkan perubahan warna sehingga menandakan hasil negatif tidak mengandung alkaloid, steroid dan terpenoid.

Nilai Rf merupakan parameter untuk menilai distribusi komponen dan pergerakan komponen senyawa terhadap pelarut. Semakin besar nilai Rf, maka semakin besar jarak senyawa tersebut bergerak pada plat KLT.



**Gambar 3.** Hasil KLT F1-F7 ekstrak *Phyllanthus niruri*, L. yang sudah disemprot reagen; A. Disemprot dengan reagen formaldehyde; B. Disemprot dengan reagen  $FeCl_3$ ; C. Disemprot dengan reagen dragendorff (Gambar disertai dengan perubahan kontras).

## PEMBAHASAN

### Daya Hambat Tunggal Fraksi Semi Polar F1-F7 *Phyllanthus niruri*, L. terhadap *S. aureus* atau *E. coli*

Fraksi F1-F7 *Phyllanthus niruri*, L. dalam dosis 30  $\mu$ L memiliki efek antibakteri terhadap *S. aureus* kecuali pada fraksi 2. Menunjukkan tidak adanya aktivitas antibakteri (Tabel 1). Berdasarkan hasil uji fitokimia hanya fraksi 5, 6, dan 7 yang memiliki senyawa aktif fenol sebagai antibakteri. Namun demikian F1, F3, dan F4 juga memiliki sifat antibakteri. Hal ini karena terjadi pada fraksi 1, 3, dan 4 diduga mengandung senyawa fenol yang sesuai dengan hasil uji fitokimia. Mekanisme kerja fenol sebagai antibakteri adalah merusak membrane sitoplasma dan dinding sel juga dapat mempresipitasi protein dalam sel bakteri.<sup>17</sup>

Sedangkan pada fraksi F1-F7 *Phyllanthus niruri*, L. dalam dosis 30  $\mu$ L memiliki efek antibakteri terhadap *E. coli* pada fraksi 1, 3, 4, 5, dan 7, sedangkan fraksi 2 dan 6 tidak ditemukan adanya aktivitas antibakteri (Tabel 1). Pada fraksi F5 dan F7 kemungkinan senyawa tersebut bersifat antibiotik *broad spectrum* karena secara tunggal mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif maupun gram positif.<sup>18</sup> Namun pada bakteri gram positif lebih rentan terhadap ekstrak tanaman dibandingkan dengan bakteri gram negatif.<sup>19</sup> Hal ini karena membran luar dan dalam bakteri gram negatif mengandung fosfolipid dan lipopolisakarida yang lebih tahan terhadap banyak zat lingkungan termasuk antibiotik.<sup>20</sup>

### Daya Hambat Kombinasi Fraksi Semi Polar F1-F7 *Phyllanthus niruri*, L. dengan Amoxicillin atau Chloramphenicol terhadap *S. aureus* atau *E. coli*

Hasil pengujian statistik non-parametrik *Mann Whitney Test* menunjukkan bahwa kombinasi antara fraksi F1-F7 dengan *chloramphenicol* terhadap *S. aureus* didapatkan hasil *not distinguishable* yang berarti jenis interaksi tidak dapat dibedakan dan memiliki hasil yang tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) (Tabel 1). Begitupula fraksi F1-F7 dengan *amoxicillin* terhadap *S. aureus* didapatkan hasil *not distinguishable*. Berbeda dengan fraksi F6, didapatkan hasil sinergis dan memiliki hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Hal ini karena rerata kombinasi herbal dan antibiotik *amoxicillin* lebih tinggi dibandingkan herbal tunggal. Kombinasi *Phyllanthus niruri*, L. Dengan *amoxicillin* terhadap *S. aureus* bersifat sinergis karena keduanya memiliki senyawa aktif yang sama-sama bekerja pada dinding sel bakteri.

Kombinasi herbal dan antibiotik dapat bersifat sinergis maupun *not distinguishable*. Pada fraksi F3 bersifat sinergis dan fraksi 1, 2, 4, 5, 6, dan 7 bersifat *not distinguishable* dengan *chloramphenicol* terhadap *E. coli* (Tabel 1). Selain itu, fraksi F1-F7 juga bersifat *not distinguishable*

dengan *amoxicillin* terhadap *E. coli* (Tabel 1). Didapatkan hasil sinergis yang berarti jenis interaksi dari rerata kombinasi herbal dan antibiotik *chloramphenicol* lebih tinggi dan memiliki hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ).<sup>21</sup>

Efek kombinasi dengan hasil *not distinguishable* pada penelitian ini memiliki beberapa factor bias diduga karena beberapa hal, yaitu *amoxicillin* atau *chloramphenicol* yang digunakan tidak stabil karena menggunakan pelarut *aquadest* dan digunakan disuhu ruang yang terlalu lama. Pada pelarut *amoxicillin* seharusnya menggunakan dapar, sedangkan *chloramphenicol* dengan menggunakan etanol. Penggunaan pelarut yang sesuai diperlukan untuk menjaga stabilitas antibiotik. Stabilitas antibiotik juga dipengaruhi lingkungan luar seperti suhu, udara, cahaya, dan kelembapan. Suhu yang tinggi dapat menyebabkan penurunan kadar dari antibiotik tersebut. Antibiotik *amoxicillin* akan lebih stabil pada suhu 4-8°C dibandingkan suhu ruang 27-29°C.<sup>22</sup>

### Analisa Kandungan Senyawa Aktif Fraksi Semi Polar F1-F7 *Phyllanthus niruri*, L.

Pada uji skrining fitokimia yang menggunakan reagen *FeCl<sub>3</sub>* didapatkan perubahan warna pada F5, F6, dan F7 didapatkan perubahan warna biru kehitaman menandakan adanya senyawa aktif fenol. Akan tetapi pada F1, F2, F3, dan F4 tidak mengandung fenol karena tidak terjadi perubahan warna (Tabel 2). Hasil tersebut memiliki berbagai kandungan senyawa aktif fenol dan derivatnya/turunannya diantaranya yaitu; *simple phenol*, *phenolic acid*, *quinone*, *flavonoid*, *flavone*, *flavonol*, *tannin* dan *coumarin*.<sup>23</sup>

Senyawa aktif tersebut memiliki sifat sebagai antibakteri yang bekerja dengan merusak membran plasma pada bakteri.<sup>24</sup> Senyawa fenol merupakan kelompok senyawa besar yang ada pada tanaman, senyawa ini memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan ditemukan didalam vakuola tanaman. Sedangkan hasil uji fitokimia dengan penyemprotan reagen *dragendorff* dan *formaldehyde*, senyawa tersebut tidak terjadi perubahan warna dikarenakan eluen yang digunakan adalah etil asetat, sehingga senyawa aktif yang didapatkan hanya yang bersifat semi polar. Pada fraksi F1-F7 tidak didapatkan perubahan warna *orange* ataupun coklat sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi F1-F7 tidak memiliki senyawa aktif alkaloid dan steroid.<sup>25</sup>

Perbedaan nilai *R<sub>f</sub>* (*Retention factor*) ini disebabkan karena perbedaan pergerakan komponen senyawa terhadap pelarut. Nilai *R<sub>f</sub>* pada plat KLT dapat digunakan dalam mengidentifikasi distribusi dan pergerakan suatu senyawa terhadap pelarut. Jika nilai *R<sub>f</sub>* memiliki nilai yang sama, maka senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Jika semakin kecil nilai *R<sub>f</sub>* dan semakin pelan senyawa tersebut bergerak naik, maka kepolaran senyawa semakin bertambah.<sup>26</sup>



## KESIMPULAN

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Fraksi semi polar F1, F3, F4, F5, F6, dan F7 ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L. memiliki zona inhibisi atau aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E.coli*. Sedangkan F6 hanya pada *S.aureus*.
2. Kombinasi ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L. Fraksi F3 dengan *chloramphenicol* memiliki interaksi sinergis terhadap *S.aureus* dan kombinasi ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L. fraksi F6 dengan *amoxicillin* memiliki interaksi sinergis terhadap *E. coli*.
3. Fraksi semi polar memiliki senyawa aktif fenol pada fraksi F5, F6, dan F7.

## SARAN

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

1. Melarutkan antibiotik dengan pelarut yang sesuai, yang memiliki solubilitas dan stabilitas yang tinggi.
2. Melakukan penelitian lanjutan uji *Zone of Inhibition* (ZOI) pada fraksi semi polar (F1-F7) ekstrak metanolik *Phyllanthus niruri*, L. Menggunakan konsentrasi yang lebih besar untuk mempengaruhi daya hambat pada kombinasi *Phyllanthus niruri*, L. dengan antibiotik *amoxicillin* dan *chloramphenicol* terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli*.
3. Melakukan isolasi dan identifikasi senyawa alkaloid, fenol, steroid dan terpenoid sebelum dilakukan pengujian antibakteri pada fraksi F1-F7 untuk mendapatkan antibiotik yang lebih poten.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada yang telah mendanai dan mensupport penelitian ini pada ikatan orang tua mahasiswa (IOM). Serta, bpk H. Yudi Purnomo, S.Si, Apt, M.Kes selaku reviewer jurnal.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Darmadi. Infeksi Nosokomial: Problematika dan pengendaliannya. Jakrta: Salemba Medika.2008.
2. Brooks, G.F.,Butel,J.S, and Morse, S.A. 2007. Jawetz. Melnick. Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran. edisi 23. diterjemahkan Hartanto, H. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC.2007.
3. Ihsan, S; Kartina, dan N.I Akib. Studi Penggunaan Antibiotik Non Resep. Media Farmasi. 2016; Vol. 13 No. 2: 272-284
4. Goodman & Gilman. Dasar Farmakologi Terapi. Edisi 10. Editor Joel. G. Hardman & Lee E. Limbird. Konsultan Editor Alfred Goodman Gilman. Diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2008
5. 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.
6. Robinson, T. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Edisi VI. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. ITB Bandung. 1995. 191-216
7. Putri, I. A., Risandiansyah, R. & Faisal. Efek Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*) dengan Antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol dan Kotrimoksazol terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *J. Kedokt. Komunitas* 6, 1–13. 2018.
8. Cheesman, M. J., Ilanko, A., Blonk, B. & Cock, I. E. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution *Pharmacogn. Rev.* 11, 57–72. 2017.
9. Susilo, W. A. Efek Penambahan Fraksi Semi Polar Ekstrak Metanolik Herba *Phyllanthus niruri*, L. terhadap Daya Hambat *Amoxicillin* dan *Chloramphenicol* pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J. Kedokt. Komunitas* 7, 1–7.2019.
10. J.B., Harbone. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (alih bahasa: Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro). Bandung: ITB. 2006.
11. Samuel G. Levine. Journal of Chemical Education. 1996; 72(1), A4. Doi: 10.1021/ed073pA4.
12. Au 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.
13. Risandiansyah, R. *Induction of Secondary Metabolism Across Actinobacterial General (Thesis)*. Flinders. 2016.
14. Parija. Textbook of Microbiology & Immunology. India: Elsevier. 2009.
15. Ziaei-darounkalaei, N. & Ameri, M. AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. *MethodsX* 3, 43–52. 2016.
16. Wardati, F. Efek Daya Hambat Kombinasi Fraksi Semi Polar (F33-37) *Elephantopus scaber* dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. 2019.
17. Damayanti, E., dan T. B. Suparjana. Efek penghambatan beberapa fraksi ekstrak buah mengkudu terhadap *Shigella dysenteriae*. Purwokerto: Universitas Jenderal Soedirman Press. 2007

18. Nor AS, Darah I, Shaida FS, Nurul AZ. Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 cells by hexane extract of *Halimeda discoidea* (Decaisne) and the identification of its potential bioactive compounds. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. 872-881.
19. Inouye, S. Takizawa, T. and Yamaguchi, H. Antibacterial Activity of Essential Oil and their Major Constituents Against Respiratory by Gaseous Contact, *J. Antimic. Chemo.* 2001. 565-573.
20. Pelczar, M. J, Chan, E. C. S.,. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Universitas Indonesia Press. 1988.
21. Chevereau, G. & Bollenbach, T. Systematic discovery of drug interaction mechanisms. *Mol. Syst. Biol.* 11, 1–9 .2015.
22. Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maissey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 2008. *PLoS ONE* 12(2): e0172273. doi:10.1371/journal.pone.0172273.
23. Alfian, B., & Susanti R., Analisis Senyawa Fenolik, Universitas Diponegoro Press, Semarang. 2012. 43-65.
24. Cowan, Marjorie Murphy. Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology review*. 1999;12(4),564-582.
25. Vermerris, W. and Nicholson, R. Phenolic Compound Biochemistry, Springer, The Netherlands. 2006.
26. Lipsy, P. Thin Layer Chromatography Characterization of the Active Ingredients in Excedrin and Anacin. USA: Department of Chemistry and Chemical Biology. Stevens Institute of Technology. 2010.