

EFEK PENAMBAHAN FRAKSI SEMI POLAR (F1-F10) EKSTRAK METANOL ALANG-ALANG PADA DAYA HAMBAT AMOKSISILIN DAN KLORAMFENIKOL TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

Rindu Desita, Rio Risandiansyah, Zainul Fadli
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang
Email: rindudesita07@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Strategi peresepan antibiotik yang tepat akan 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 Alang-alang. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kelompok senyawa semi-polar yang belum pernah diteliti sebelumnya dan menguji kombinasi senyawa tersebut dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol, pada 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*, *FeCL₃*, dan *dragendorff* pada Kromatografi Lapis Tipis. Hasil diuji dengan SPSS dan dianggap signifikan jika $p < 0,05$.

Hasil: Proses fraksinasi menghasilkan 10 fraksi. Secara tunggal, semua fraksi tidak aktif terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Secara kombinasi, fraksi 1 meningkatkan aktivitas Amoksisilin dengan nilai ZOI 5.6 ± 5.1 dan Kloramfenikol dengan nilai ZOI 11.3 ± 1.5 pada *S. aureus*. Namun, pada *E. coli*, kombinasi fraksi 1 menyebabkan penurunan aktivitas Kloramfenikol dengan nilai ZOI 15 ± 0 . Fraksi 1-8 mengandung alkaloid dan fraksi 3-7 mengandung fenol.

Kesimpulan: Fraksi 1-10 Alang-alang tidak mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri. Pada fraksi 1 memiliki kandungan senyawa alkaloid. Fraksi 1 bersifat potensiasi dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol pada *S. aureus*, Namun, bersifat antagonis dengan Kloramfenikol pada *E. coli*.

Kata Kunci: *Imperata cylindrica*, Amoksisilin, Kloramfenikol, ZOI, Kombinasi Herbal dan Antibiotik.

THE EFFECTS OF SEMI POLAR FRACTION (F1-F10) METANOL EXTRACT ALANG-ALANG IN *Amoxicillin* AND *Chloramphenicol* INHIBITION ON *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*

Rindu Desita, Rio Risandiansyah, Zainul Fadli
Faculty of Medicine, University of Islam Malang
Email: rindudesita07@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: 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 Alang-alang. This research aims to examine the group of semi 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, *FeCL₃*, and *dragendorff* of thin layer of chromatography. The result was analyzed by using SPSS with the significant level of $p < 0,05$.

Results: Fractionation produces 10 fractions. Individually, all of the fractions are not active towards *S. aureus* dan *E. coli*. While combination, fraction 1 increases *amoxicillin* with a ZOI value of 5.66 ± 5.13 activities and *chloramphenicol* with a ZOI value of 11.33 ± 1.52 activities on *S. aureus*. However, on *E. coli* the combination fraction 1 cause decreases *chloramphenicol* with a ZOI value of 15 ± 0 . Fractions 1-8 contain *alkaoid*, and fractions 3-7 contain *fenol*.

Conclusion: Fractions 1 to 10 of Alang-alang do not contain compound which has an antibacterial activity. In Fractions 1 has alkaloids content. Fraction 1 has potential with *amoxicillin* and *chloramphenicol* towards *S. aureus*. However, it is antagonistic with *chloramphenicol* towards *E. coli*.

Keywords: *Imperata cylindrica*, *Amoxicillin*, *Chloramphenicol*, ZOI, herbs and antibiotics combination

PENDAHULUAN

Prevalensi kejadian infeksi yang meningkat akan menyebabkan penggunaan antibiotik juga meningkat¹. Namun, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dosis, macam dan lama pemberian akan mengakibatkan terjadinya penurunan sensitifitas mikroorganisme terhadap antibiotik, yang disebut sebagai resistensi antibiotik². Setiap tahunnya terdapat 440.000 kasus baru dari *multidrug-resistant (MDR)*, hingga menyebabkan kematian sekitar 150.000 orang³.

Bakteri yang banyak ditemukan resisten terhadap antibiotik adalah bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Bakteri *S. aureus* ditemukan resisten terhadap berbagai antibiotik seperti sefalosporin, penisilin dan karbapenem⁴. Sedangkan bakteri *E. coli* diketahui resisten terhadap antibiotik ampisilin (34%), kotrimoksazol (29%) dan kloramfenikol (25%)⁵. Permasalahan resistensi antibiotik memerlukan cara untuk mengatasinya yaitu dengan mengkombinasikan antibiotik dengan tanaman herbal untuk meningkatkan aktivitas antibiotik terhadap bakteri⁶. Sebagai contoh ekstrak etanol *Cecendet (Physalis angulate L.)* yang mampu meningkatkan aktivitas dari antibiotik tetrasiklin terhadap bakteri *S. aureus*⁷. Selain itu salah satu tanaman herbal yang berkhasiat untuk antibakteri adalah Alang-alang (*Imperata cylindrica*)⁸.

Sebelumnya dilaboratorium kami telah melakukan penelitian kombinasi antibiotik kotrimoksazol, amoksisilin dan kloramfenikol dengan tanaman herbal Alang-alang. Penelitian tersebut menemukan hasil kombinasi herbal Alang-alang dengan amoksisilin dan kloramfenikol bersifat additif terhadap *E. coli* dan *S. aureus*⁹. Hasil additif yaitu menandakan bahwa tidak adanya interaksi antara herbal dengan antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*¹⁰.

Ekstrak Alang-alang yang telah diteliti sebelumnya merupakan ekstrak tanpa perlakuan fraksinasi sehingga mengandung banyak senyawa aktif⁹. Senyawa-senyawa aktif ini bisa berinteraksi satu sama lain, dengan efek kumulatif yang tidak diketahui. Diduga interaksi seperti itulah yang menyebabkan efek kombinasi Alang-alang dengan antibiotik bersifat additif¹¹. Berdasarkan hal itu, penelitian ini akan melakukan fraksinasi dari ekstrak herbal Alang-alang untuk mencari fraksi aktif yang memiliki daya hambat yang berbeda atau sama dengan ekstrak kasar terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Proses fraksinasi menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Perbedaan pelarut ini dapat mempengaruhi kandungan total senyawa aktif dikarenakan perbedaan polaritas dari pelarut. Pada penelitian ini dilakukan pangujian fraksi-fraksi dari eluen *etil-asetat* yang memiliki sifat semi-polar. Dengan pelarut ini diharapkan mendapatkan senyawa

aktif yang bersifat semi polar yang lebih terpisah dan bersifat sinergis terhadap uji zona inhibisi (ZOI) kombinasi.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorium secara *in vitro*, untuk mengetahui efek kombinasi fraksi herbal Alang-alang dengan amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *Zone of Inhibition (ZOI)* dibandingkan dengan (ZOI) tunggal terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga April 2019, di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Herbal Medik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Pembuatan Ekstrak Metanol Alang-alang

Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi diawali dengan mempersiapkan simplisia Alang-alang yang didapatkan dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Simplisia ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 40 gr dan diberikan methanol 96% sebanyak 400 ml untuk direndam didalam Erlenmeyer, di dalam dua atau lebih Erlenmeyer yang berbeda. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan diamankan didalam *shaker water bath* dengan kecepatan 5 selama 18-24 jam. Setelah itu hasil ekstrak disaring untuk memperoleh filtrat menggunakan *vaccum buchner*, kemudian filtrat tersebut di evaporasi menggunakan *Rotary vacuum evaporator* dengan pengaturan suhu 55°C hingga volume filtrat berkurang atau mengental. Hasilnya ditampung didalam gelas beaker 250 ml dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50°C selama 3 hari. Ekstrak didiamkan sampai menjadi lebih kental, lalu disimpan didalam kulkas sampai akan digunakan.

Metode Fraksinasi Alang-alang

Ekstrak pekat metanol herbal Alang-alang difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam dan fasa gerak, fasa diam yaitu menggunakan resin silica gel dan fasa gerak yaitu menggunakan campuran pelarut *methanol* dan *ethyl acetate*. Penggunaan pelarut organik tersebut dengan perbandingan yang berbeda yaitu : (1) Etil Asetat, (2) Etil Asetat : Metanol (9:1), (3) Etil Asetat : Metanol (3:1), (4) Etil Asetat : Metanol (1:1), (5) Etil Asetat : Metanol (1:3), (6) Metanol dan dibuat sejumlah 50 ml. Pada setiap fraksi yang didapat dilakukan uji Kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengkonfirmasi hasil dari Kromatografi kolom secara kualitatif. KLT dilakukan menggunakan F254 Silica plate yang telah diaktifasi dalam oven dengan suhu 50°C selama 15 menit, *spotting* menggunakan *yellow tip*. Plat KLT dimasukkan kedalam *chamber* yang diisi larutan metanol-ethyl acetate (7:3), tunggu

pelarut hingga mencapai batas atas dari KLT. Lalu KLT dilihat menggunakan UV dan dilakukan perhitungan R_f dengan rumus yaitu,

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

Hasil fraksi yang memiliki warna yang sama dan nilai R_f yang serupa, dianggap memiliki senyawa yang sama.

Metode 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. Pencampuran dilakukan secara terpisah sesuai antibiotik yang diperlukan 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.

Metode Pour Plate untuk Pembuatan Metode Uji

Pada metode *Pour plate*, yang pertama dilakukan adalah mempersiapkan inokulum dengan menggunakan spektrofotometer. Koloni isolat bakteri pada media padat dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% menggunakan oshe steril hingga warna NaCl menjadi keruh. Kemudian, tabung reaksi divorteks untuk homogenisasi bakteri. Sampel bakteri diambil menggunakan mikropipet sebanyak 3 ml untuk dimasukkan ke dalam kuvet, selanjutnya dibaca menggunakan spektrofotometer dengan pengaturan panjang gelombang 600 nm. Hasil dari absorbansi digunakan untuk patokan dalam pengenceran yang menggunakan NaCl 0,9% steril, dengan rumus yaitu target OD600nm adalah 0,2 :

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

Uji aktivitas antimikroba yaitu menggunakan media agar. Media padat dibuat dengan cara mencampurkan natrium agar dan aquades dengan

perbandingan 20g/l, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf. Suhu media ditunggu sampai kurang dari 50°C, lalu masukan inokulum sebanyak 1% (10 ml/liter media) dan aduk hingga inokulum tercampur rata. Setelah tercampur rata tuangkan media ke cawan petri sebanyak kisaran 20-25 ml pada cawan petri yang berukuran 90 mm.

Zone of Inhibition (ZOI) Tunggal dan Kombinasi

Zone of Inhibition ini dilakukan dengan metode sumuran untuk menilai *Zone of Inhibition* tunggal. Sedangkan untuk *Zone of Inhibition* kombinasi menggunakan metode AZDAST. Terlebih dahulu disiapkan biakan agar yang telah diinokulasi bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Pembuatan sumuran dilakukan menggunakan alat *Cork Borer* dengan ukuran 6 mm, sebanyak 10 sumuran disetiap cawan petri. Pada metode sumuran, sampel antibiotik *Amoxicillin* dan *Chloramphenicol* ataupun fraksi dari herbal Alang-alang diletakkan pada lubang sumuran media agar, sedangkan untuk metode AZDAST letakan sampel fraksi Alang-alang dengan antibiotik *Amoxicillin* dan *Chloramphenicol* yang telah diencerkan sesuai dosis yang ditentukan yaitu sebanyak 30 ul, dengan perbandingan 1:1, tunggu sampai kering lalu inkubasi plate pada suhu 37 °C selama 1 hari dengan posisi terbalik. Apabila terdapat zona bening disekitar lubang menandakan bahwa bahan tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Zona bening tersebut diukur diameternya dengan penggaris milimeter. Tingkat kekuatan daya hambat dapat dikategorikan menjadi lemah jika ukuran diameter hambatnya $\leq 5\text{mm}$, sedang jika 5-10, kuat jika $>20\text{mm}$ ¹².

Hasil ZOI kombinasi diinterpretasikan menggunakan metode AZDAST. Hasil dikatakan sinergis apabila diameter zona bening pada kombinasi antara antibiotik dengan herbal (A+B) lebih besar dari pada herbal tunggal (B) dan antibiotik tunggal (A), dan lebih kecil atau lebih besar dari herbal dengan dosis ganda (BB) dan atau antibiotik dengan dosis ganda (AA). Hasil antagonis apabila didapatkan A+B lebih kecil dari A atau B. Sedangkan dikatakan additif apabila A+B sama dengan AA atau BB. Hasil dikatakan potensiasi jika A atau B didapatkan sama dengan 0, A+B lebih besar dari A dan B, dan lebih kecil atau lebih besar dari AA dan atau BB. Jika A+B sama dengan salah satu dari A atau B maka tidak dapat diketahui¹³.

Uji Fitokimia

Uji Fitokimia digunakan untuk proses identifikasi terhadap tanaman herbal yang memiliki potensi sebagai obat herbal dan digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat didalam tanaman herbal tersebut. Uji iodine dilakukan terlebih dahulu menggunakan serbuk iodine yang diletakkan didalam chamber, kemudian KLT diletakkan di tengahnya dan tunggu beberapa menit. Selanjutnya

bagian fraksi diamatibagian yang menunjukkan adanya kandungan senyawa aktif.

Kandungan senyawa aktif yang diidentifikasi pertama adalah kandungan alkaloid, yaitu dengan menyempatkan larutan *drganedroff* pada KLT yang sebelumnya sudah *spotting* fraksi 1-10 ekstrak metanol Alang-alang. Kemudian KLT diamati dan dicatat jika adanya perubahan warna menjadi kuning keemasan menandakan adanya kandungan alkaloid didalamnya¹⁴. Untuk uji fitokimia yang kedua yaitu mendeteksi adanya kandungan fenol yang menggunakan reagen $FeCl_3$. KLT disempatkan dengan reagen tersebut, kemudian KLT diamati dan dicatat perubahan warnanya. Hasil positif adanya senyawa tersebut ditandai adanya perubahan warna menjadi biru kehitaman¹⁵.

Uji fitokimia yang selanjutnya menggunakan reagen *formaldehyde* yang digunakan untuk mendeteksi adanya kandungan Steroid, alkaloid, saponin dan derivat *phenothiazine*. KLT di sempot dengan reagen tersebut, kemudian KLT diamati dan dicatat apabila adanya perubahan warna menjadi kecoklatan menandakan adanya senyawa tersebut¹⁶.

Analisa Data Statistik

Hasil dari *Zone of Inhibition* tunggal dan kombinasi dibaca menggunakan mistar dengan tingkat ketelitian 1 mm dan dimasukkan pada *Statistical Package for the Social Sciences*(SPSS) diolah untuk mendapatkan rata-rata dan standar deviasi. Pada Uji Statistik menggunakan uji parametrik *dependent T Test* yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara dua variabel yaitu variabel ZOI tunggal dan ZOI kombinasi untuk setiap fraksi aktif herbal.

HASIL

Hasil Pengukuran *Zone of Inhibition* (ZOI) Tunggal Antibiotik

Zona of Inhibition (ZOI) merupakan zona bening (*clear zone*) yang terdapat disekitar lubang sumuran yang diukur diameternya menggunakan mistar dengan satuan mm. Uji ZOI digunakan untuk melihat adanya penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh suatu senyawa yang terdapat didalam suatu ekstrak, semakin besar hambatan pertumbuhan mikroorganisme maka semakin besar diameter yang terbentuk¹⁷. Pengukuran ZOI antibiotik tunggal digunakan sebagai patokan dalam menginterpretasikan hasil uji ZOI kombinasi antara fraksi semi polar 1-10 ekstrak metanol Alang-alang dengan antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Hasil ZOI amoksisilin pada dilusi ke-1 dengan konsentrasi 100 mg/ml terhadap bakteri *S. aureus* adalah berdiameter $21,3 \pm 1,15$ mm, sedangkan hasil ZOI pada kloramfenikol didapatkan diameter $15, \pm 2,08$ mm. Hal ini menunjukkan bahwa amoksisilin

memiliki hasil ZOI lebih besar dibandingkan dengan kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus*. Sedangkan hasil pengukuran ZOI antibiotik terhadap bakteri *E. coli* menunjukkan antibiotik amoksisilin dengan konsentrasi 10 mg/ml terhadap bakteri *E. coli* didapatkan ZOI dengan diameter $11,21 \pm 6,10$ mm, sedangkan pada antibiotik kloramfenikol didapatkan ZOI dengan diameter 14 ± 1 mm. Hal ini menunjukkan bahwa kloramfenikol memiliki hasil ZOI lebih besar dibandingkan dengan amoksisilin terhadap bakteri *E. coli*¹⁸.

Hasil Pengukuran *Zone of Inhibition* (ZOI) Kombinasi Herbal dan Antibiotik terhadap *S.aureus*

Pengujian ZOI fraksi Alang-alang dengan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol terhadap bakteri *S.aureus* dilakukan pembuatan sumuran sebanyak 6 sumuran yang mana untuk sampel fraksi tunggal (Fx), fraksi tunggal dengan dosis dua kali (FxFx); antibiotik amoksisilin tunggal (A), antibiotik amoksisilin dengan dosis dua kali (AA); antibiotik kloramfenikol tunggal (C) dan antibiotik kloramfenikol dengan dosis dua kali (CC). Hasil pengukuran ZOI dapat dilihat pada gambar 1 tabel 1.

Tabel 1. Rerata Dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi pada Pengujian Tunggal Antara Fraksi Alang-alang dengan Kloramfenikol dan Amoksisilin terhadap Bakteri *S.aureus*

| No. Fraksi | Kloramfenikol | | Amoksisilin | |
|------------|---------------|---------------------|----------------|---------------------|
| | Rerata(mm)±SD | Jenis Interaksi | Rerata (mm)±SD | Jenis Interaksi |
| F1 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 8.33±0.57 | potensiasi | 3±5.19 | potensiasi |
| F1A | 11.33±1.52 | | 5.66±5.13 | |
| F2 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 11.66±2.30 | not distinguishable | 9.66±0.57 | not distinguishable |
| F2A | 12±0 | | 6.33±5.50 | |
| F3 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 0±4.04 | not distinguishable | 10.33±2.30 | not distinguishable |
| F3A | 7.33±6.42 | | 3±5.19 | |
| F4 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 11±2.64 | not distinguishable | 0±0 | not distinguishable |
| F4A | 12.33±1.52 | | 0±0 | |
| F5 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 5.66±4.93 | not distinguishable | 8.66±0.57 | not distinguishable |
| F5A | 6±5.19 | | 6.33±5.50 | |
| F6 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 12.33±1.15 | not distinguishable | 9.33±0.57 | not distinguishable |
| F6A | 12.33±1.15 | | 9±2 | |
| F7 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 12.66±0.57 | not distinguishable | 10±1 | not distinguishable |
| F7A | 13.66±2.08 | | 10±1.73 | |
| F8 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 13.33±1.52 | not distinguishable | 10.66±1.52 | not distinguishable |
| F8A | 12.66±1.52 | | 9.66±0.57 | |
| F9 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 14.66±0.57 | not distinguishable | 11±1 | not distinguishable |
| F9A | 14.33±1.52 | | 11.66±0.57 | |
| F10 | 0±0 | | 0±0 | |
| A | 14.33±0.57 | not distinguishable | 8.33±0.57 | not distinguishable |
| F10A | 15.33±1.52 | | 5.33±4.61 | |

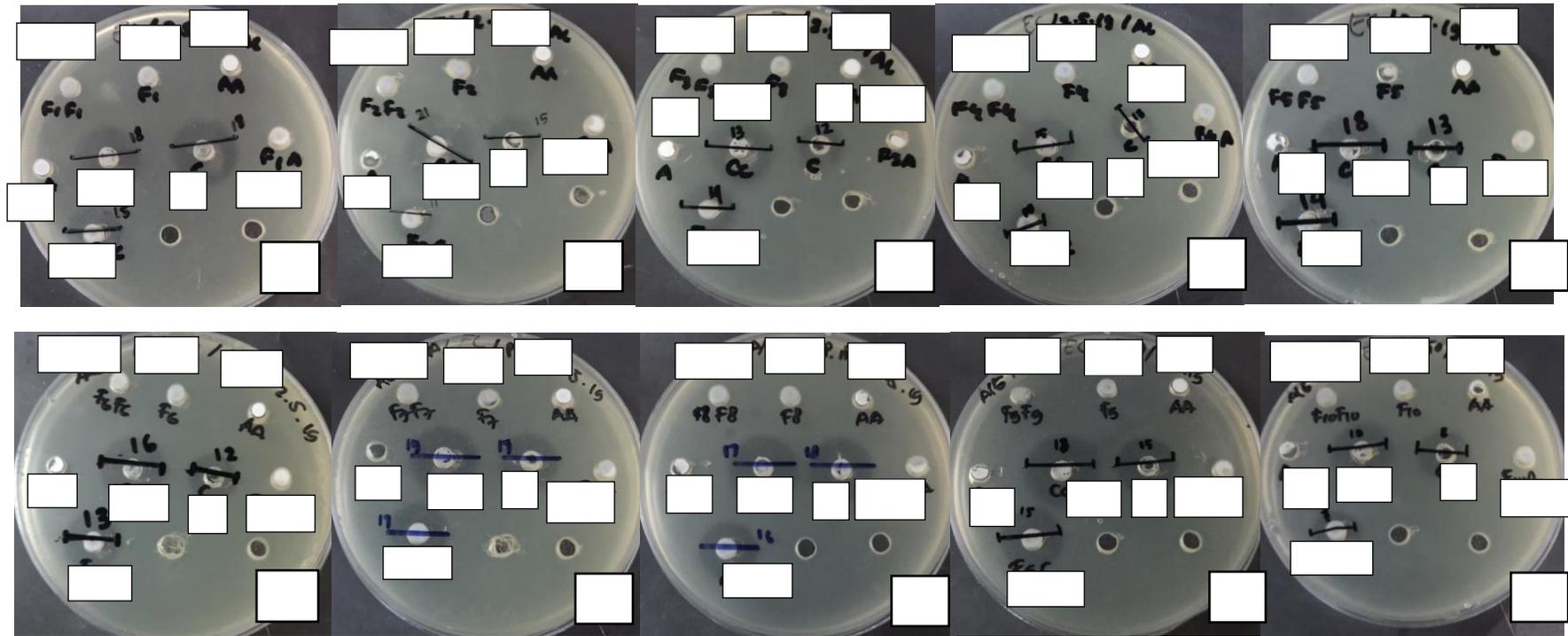
Keterangan: Fx= uji zoi tunggal fraksi Alang-alang dosis 15µl; A= uji zoi tunggal antibiotik dengan dosis 15µl; FxC/A= uji zoi kombinasi fraksi Alang-alang dan kloramfenikol atau amoksisilin. *a berbeda signifikan (P<0,05) terhadap Fx, b berbeda signifikan (p<0,05) terhadap A.

Pada Tabel 1 dan Gambar 1 diatas menunjukkan bahwa uji kombinasi antara fraksi Alang-alang dengan antibiotik kloramfenikol dan amoksisilin didapatkan hasil yang sama yaitu signifikan (p<0,05) pada fraksi 1, sedangkan pada fraksi lainnya tidak signifikan (p>0,05), uji ini dilakukan dengan menggunakan uji statistik non parametrik *Mann-Whitney Test*, sehingga fraksi 2-10 memiliki interaksi *not distinguishable* atau tidak dapat dibedakan sedangkan fraksi 1 memiliki interaksi potensiasi karena hasil kombinasi antara fraksi 1 dengan

antibiotik kloramfenikol dan amoksisilin lebih besar dibandingkan dengan herbal tunggal dan antibiotik tunggal, namun pada herbal tunggal bernilai 0.

Hasil Pengukuran *Zone of Inhibition (ZOI)* Kombinasi Herbal dan Antibiotik terhadap *E. coli*

Hasil pengukuran ZOI antara fraksi herbal Alang-alang dengan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol pada bakteri *E. coli* dapat dilihat pada gambar 2 dan tabel 2.



Gambar 2. Hasil Pengujian Bersama ZOI Fraksi 1-10 Alang-alang dan Antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol pada Bakteri *E. coli* yang dilakukan dengan 3 kali pengulangan; **A.** Fraksi 1 ekstrak metanol Alang-alang, F1F1= Fraksi 1 dosis 30 μ l, F1= Fraksi 1 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 metanol Alang-alang; **C.** Fraksi 3 ekstrak metanol Alang-alang; **D.** Fraksi 4 ekstrak metanol Alang-alang **E.** Fraksi 5 ekstrak metanol Alang-alang; **F.** Fraksi 6 ekstrak metanol Alang-alang; **G.** Fraksi 7 ekstrak metanol Alang-alang; **H.** Fraksi 8 ekstrak metanol Alang-alang; **I.** Fraksi 9 ekstrak metanol Alang-alang; **J.** Fraksi 10 ekstrak metanol Alang-alang.

Tabel 2. Rerata Dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi pada Pengujian Bersama Antara Fraksi Alang-alang dengan kloramfenikol terhadap Bakteri *E.coli*

| No. Fraksi | Rerata (mm)±SD | Jenis Interaksi |
|------------|----------------|---------------------|
| F1 | 0±0 | |
| A | 17±1 | antagonis |
| F1A | 15±0(a,b) | |
| F2 | 0±0 | |
| A | 18±2.64 | not distinguishable |
| F2A | 13.66±3.05 | |
| F3 | 0±0 | |
| A | 14±1.73 | not distinguishable |
| F3A | 13.33±2.08 | |
| F4 | 0±0 | |
| A | 15±2 | not distinguishable |
| F4A | 12.66±2.30 | |
| F5 | 0±0 | |
| A | 14±1 | not distinguishable |
| F5A | 13.33±1.15 | |
| F6 | 0±0 | |
| A | 13.33±1.15 | not distinguishable |
| F6A | 14±1.73 | |
| F7 | 0±0 | |
| A | 16±1.73 | not distinguishable |
| F7A | 16.66±0.57 | |
| F8 | 0±0 | |
| A | 16.66±1.52 | not distinguishable |
| F8A | 15±1.73 | |
| F9 | 0±0 | |
| A | 15±4.89 | not distinguishable |
| F9A | 10.66±3.09 | |
| F10 | 0±0 | |
| A | 9.66±1.69 | not distinguishable |
| F10A | 8.33±1.24 | |

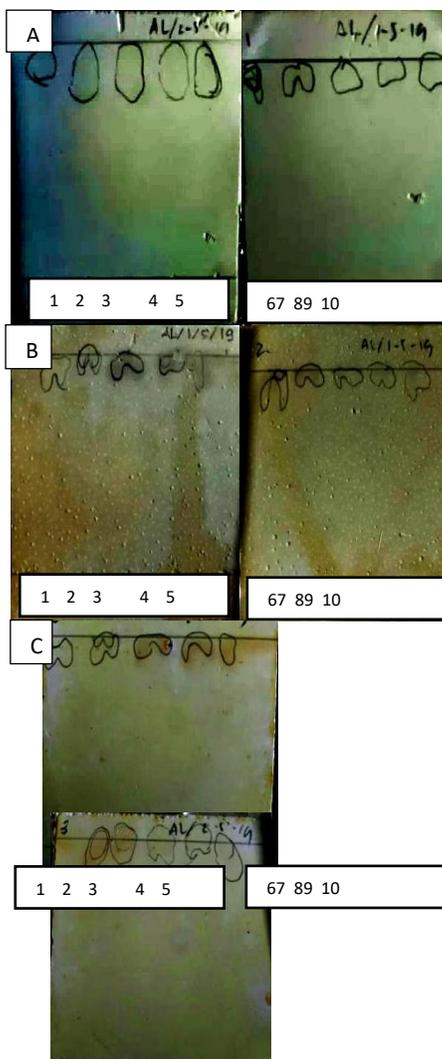
Keterangan: Fx= uji zoi tunggal fraksi Alang-alang dosis 15µl; A= uji zoi tunggal Antibiotik dengan dosis 15µl; FxC= uji zoi kombinasi fraksi Alang-alang dan kloramfenikol. * a berbeda signifikan (P< 0,05) terhadap Fx, b berbeda signifikan (p<0,05) terhadap A.

Pada Gambar 2 dan Tabel 2 diatas menunjukkan bahwa kombinasi herbal alang-alang dengan kloramfenikol terhadap bakteri *E. coli* didapatkan fraksi 2-10 tidak signifikan (P<0,05), sedangkan fraksi 1 didapatkan hasil signifikan (P>0,05) setelah diukur dengan menggunakan uji statistik non parametrik Mann-Whitney Test, sehingga fraksi 2-10 memiliki interaksi *not distinguishable* dan fraksi 1 memiliki interaksi antagonis karena hasil kombinasi antara fraksi 1 dengan antibiotik kloramfenikol lebih kecil dibandingkan dengan herbal tunggal dan antibiotik tunggal kloramfenikol. Pada pengujian ZOI kombinasi antara fraksi semi polar (F1-10) herbal Alang-alang dengan antibiotik amoksisilin terhadap

bakteri *E. coli* tidak dilakukan perhitungan karena tidak didapatkan adanya zona bening.

Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji yang dilakukan untuk menentukan kandungan senyawa aktif pada fraksi semi polar (F1-10) ekstrak metanol Alang-alang yang menggunakan plat KLT dengan 3 reagen yaitu reagen *formaldehyde*, *FeCl₃* dan *dragendorff*. Hasil perhitungan *Rf* terdapat pada gambar 3 dan tabel 3, sebagai berikut:



Gambar 3 Hasil KLT *Spray* pada Fraksi Alang-alang; **A.** KLT *spray* dengan *reagent* formaldehyde; **B.** KLT *spray* dengan *reagent* *FeCl₃*; **C.** KLT *spray* dengan *reagent* dragendorff

Berdasarkan Gambar 3 diatas menunjukkan setelah pemberian pewarnaan *dragendorff*, didapatkan spot berwarna kuning sampai kuning keemasan pada fraksi 1-8, sedangkan pada pewarnaan *FeCl₃* didapatkan spot berwarna biru kehitaman pada fraksi 3-7 dan pada pewarnaan

formaldehid didapatkan spot berwarna kecoklatan pada fraksi 1-7.

Tabel 3. Hasil Perhitungan Rf pada KLT Spray

| No. Fraksi | Alkaloid | Fenol | Saponin |
|------------|--------------------|----------|---------|
| F1 | + (0,89;0,91) | - | - |
| F2 | + (0,77-0,82;0,86) | - | - |
| F3 | + (0,89;0,97) | + (0,97) | - |
| F4 | + (0,80;0,89) | + (0,94) | - |
| F5 | + (0,80;0,86) | + (0,91) | - |
| F6 | + (0,80-0,82;0,94) | + (0,89) | - |
| F7 | + (0,80;0,91) | + (0,82) | - |
| F8 | + (0,82) | - | - |
| F9 | - | - | - |
| F10 | - | - | - |

Ket : Rf = Jarak tempuh substansi/Jarak tempuh pelarut (3,8cm).

Berdasarkan tabel 3 dan gambar 3 diatas, hasil positif pada pewarnaan *dragendorff* didapatkan pada fraksi 1-8 dan hasil positif pada pewarnaan *formaldehyde* didapatkan pada fraksi 1-7 dengan nilai *Retention factor* (Rf) yang berbeda-beda. Pada masing-masing fraksi didapatkan 2 spot, kecuali fraksi 2 dan 6 didapatkan smear dan fraksi 8 didapatkan satu spot. Hasil positif dengan nilai Rf 0,89 didapatkan pada fraksi 1, 3 dan 4. Nilai Rf 0,91 didapatkan pada fraksi 1 dan 7. Rentang nilai Rf lainnya didapatkan yaitu dari 0,77 sampai 0,97.

Sedangkan pada pewarnaan *FeCl₃* didapatkan hasil positif pada fraksi 3-7 dengan nilai *Retention factor* (Rf) yang berbeda-beda. Pada masing-masing fraksi didapatkan satu spot dengan rentang nilai Rf yang didapat yaitu dari 0,82 sampai 0,97.

PEMBAHASAN

Pengaruh Fraksi Semi Polar (F1-F10) dari Ekstrak Metanol Alang-alang secara Tunggal terhadap *E. coli* dan *S. aureus*

Hasil *Zone of Inhibition* (ZOI) fraksi semi polar (F1-F10) ekstrak metanol Alang-alang secara tunggal pada penelitian ini menunjukkan bahwa tidak terdapatnya daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa pada fraksi 1-10 tidak mengandung senyawa aktif yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, baik terhadap bakteri gram negatif dan gram positif.

Pada penelitian ini didapatkan hasil uji fitokimia pada fraksi 1-10 ekstrak metanol Alang-alang mengandung senyawa alkaloid dan fenol. Sehingga dapat dikatakan senyawa alkaloid dan fenol tersebut bukanlah senyawa dengan aktivitas antibakteri. Komponen alkaloid yang terkandung dalam Alang-alang yaitu indol, piperidin, tomatidin, solenopsin, pergularinin, tylophorinidine, polyamine alkaloid squalamine dan 1,3,4-oksiazol¹⁹, sedangkan komponen fenol yang terdapat pada Alang-alang adalah asam fenolat, asetofenon, benzoquinone, dan xanton²⁰.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Anugraha *et al.*, (2018) menyatakan bahwa terdapatnya aktifitas daya hambat dari ekstrak metanol alang-alang terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, dengan didapatkannya diameter zona bening sebesar 10 mm pada bakteri *E. coli* dan sebesar 11 mm pada bakteri *S. aureus*¹⁰. Hal tersebut menandakan bahwa senyawa aktif yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri terdapat pada fraksi lainnya, bukan pada fraksi 1-10.

Pengaruh Kombinasi Fraksi Semi Polar (F1-F10) Ekstrak Metanol (MeOH) Alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan Amoksisilin terhadap Bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Uji ZOI kombinasi antara fraksi Alang-alang dengan antibiotik dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas yang dihasilkan pada keduanya ketika dikombinasikan. Pada penelitian ini hasil uji ZOI kombinasi antara antibiotik amoksisilin dengan fraksi semi polar (F1-F10) ekstrak metanol Alang-alang terhadap bakteri *S. aureus* didapatkan hanya fraksi 1 yang memiliki jenis interaksi potensiasi, sedangkan pada fraksi lainnya (F2-F10) memiliki jenis interaksi *Not distinguishable* atau tidak dapat dibedakan, dikatakan *Not distinguishable* yaitu apabila efek kombinasi antibiotik dengan herbal memiliki nilai rerata yang sama dibandingkan dengan antibiotik tunggal. Hasil tersebut dapat dikarenakan pada fraksi 2-10 tidak didapatkan senyawa yang bersifat sinergistik dengan amoksisilin.

Hasil uji ZOI kombinasi antibiotik amoksisilin dengan fraksi 1 herbal Alang-alang terhadap bakteri *S. aureus* memiliki hasil potensiasi diduga karena terdapatnya bias pada saat penelitian, yang ditunjukkan dengan adanya nilai standard deviasi yang tinggi (>50%) pada kombinasi tersebut. Faktor yang menyebabkan bias pada saat penelitian yaitu pada antibiotik amoksisilin tidak dilarutkan menggunakan dapar, sehingga tidak stabil dan menyebabkan penurunan aktivitas antibiotik. Akibat dari penurunan aktivitas antibiotik tersebut sehingga penghambatan pertumbuhan bakteri menjadi tidak efektif.

Sedangkan kombinasi antibiotik Amoksisilin dengan fraksi semi polar (F1-F10) ekstrak metanol Alang-alang (*Imperata cylindrica*) terhadap bakteri *E. coli* tidak dilakukan uji statistik

karena pada hasil uji ZOI tidak didapatkan zona bening (*clear zone*) atau tidak didapatkan penghambatan pertumbuhan bakteri pada semua fraksi, hal ini dikarenakan antibiotik *Amoksisilin* memiliki kerja yang lebih efektif terhadap bakteri gram positif dari pada bakteri gram negatif. Sedangkan bakteri *E. coli* merupakan bakteri negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks sehingga sulit untuk merusak dinding sel bakteri tersebut²¹.

Pengaruh Kombinasi Fraksi Semi Polar (F1-F10) Ekstrak Metanol (MeOH) Alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan Kloramfenikol terhadap Bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil ZOI kombinasi antara antibiotik *Kloramfenikol* dengan fraksi semi polar (F1-F10) ekstrak metanol Alang-alang terhadap bakteri *S. aureus* didapatkan pada fraksi 1 memiliki jenis interaksi potensiasi. Sedangkan fraksi lainnya (F2-F10) memiliki interaksi yang bersifat *not distinguishable* atau tidak dapat dibedakan.

Kombinasi antibiotik kloramfenikol dengan fraksi 1 herbal Alang-alang terhadap bakteri *S. aureus* memiliki hasil potensiasi, hal ini diduga karena terdapatnya senyawa alkaloid pada fraksi 1, senyawa alkaloid memiliki turunan, yaitu polyamine alkaloid squalamine yang berkerja dengan cara merusak membran luar dan mengganggu integritas membran sitoplasmik sehingga dinding sel tidak berbentuk secara utuh, sehingga menyebabkan masuknya kloramfenikol ke dalam bakteri menjadi lebih mudah¹⁹. Mekanisme kerja antibiotik kloramfenikol yaitu mengganggu pengikatan asam amino baru pada rantai peptida yang sedang dibentuk dikarenakan menghambat peptidil transferase, sehingga replikasi bakteri terhambat²². Dengan adanya interaksi dari senyawa polyamine alkaloid squalamine dengan antibiotik kloramfenikol sehingga menyebabkan hasil yang bersifat potensiasi.

Pada uji ZOI tunggal fraksi 1, diduga senyawa polyamine alkaloid squalamine ini bekerja secara tunggal dan dengan dosis yang sedikit sehingga tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri. Selain itu senyawa polyamine alkaloid squalamine ini merupakan senyawa yang memiliki eketifitas antibakteri yang lemah¹⁹. Dengan adanya interaksi dengan antibiotik kloramfenikol menyebabkan mekanisme kerja dari antibakteri tersebut menjadi lebih efektif.

Hasil uji ZOI kombinasi antibiotik kloramfenikol dengan fraksi semi polar (F1-F10) ekstrak metanol Alang-alang terhadap bakteri *E. coli* hanya didapatkan fraksi 1 yang memiliki jenis interaksi antagonis, hal ini karena pada hasil uji ZOI kombinasi antibiotik dengan herbal dibandingkan dengan herbal tunggal dan antibiotik tunggal memiliki nilai rerata yang lebih kecil dan memiliki

hasil yang signifikan ($P < 0,05$) pada uji statistik *Mann-Whitney Test*. Sedangkan pada fraksi lainnya (F2-F10) memiliki jenis interaksi yang bersifat *not distinguishable* atau tidak dapat dibedakan.

Pada kombinasi antibiotik kloramfenikol dengan fraksi 1 herbal Alang-alang terhadap bakteri *E. coli* memiliki hasil yang antagonis. Diketahui bahwa antibiotik kloramfenikol bekerja dengan cara mengganggu pengikatan asam amino baru pada rantai peptida yang sedang dibentuk dikarenakan menghambat peptidil transferase, sehingga replikasi bakteri pun terhambat²². Hasil antagonis diduga karena pada fraksi 1 mengandung senyawa alkaloid yang memiliki turunan, yaitu senyawa indole yang diketahui merupakan salah satu senyawa yang dapat meningkatkan virulensi dan resistensi bakteri dengan peningkatan ekspresi protein-protein yang memiliki fungsi sekresi. Salah satu protein yang dapat meningkat akibat adanya indole ini adalah protein pompa effluks²³.

Pompa effluks adalah pompa protein yang dapat menurunkan jumlah antibiotik yang terdapat didalam sel bakteri. Jenis pompa effluks pada bakteri adalah ATP binding site (ABC) transpoter, yang juga dapat ditemui di bakteri-bakteri gram positif atau negatif termasuk bakteri *E. coli*²⁴. Sehingga kombinasi dari indole dengan kloramfenikol dapat menurunkan jumlah kloramfenikol didalam sel bakteri yang berakibat terjadinya interaksi antagonis. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Lee, *et.al* pada tahun 2009 yang mendapatkan hasil antagonis. hal ini juga dapat disebabkan bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan bakteri gram positif sehingga sulit untuk di hambat oleh antibiotik²⁵.

Jenis Kandungan Senyawa Aktif dari Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji yang digunakan untuk identifikasi kandungan senyawa aktif dalam tanaman herbal yang memiliki potensi sebagai antimikroba. Fraksi 1-10 ekstrak metanol Alang-alang pada pewarnaan *formaldehid* menghasilkan spot berwarna kecoklatan pada fraksi 1 sampai 7 dengan nilai *Rf* yang tidak jauh berbeda pada masing-masing fraksi yang menunjukkan bahwa pada fraksi tersebut memiliki senyawa yang sama. Pewarnaan *formaldehid* dapat mengidentifikasi senyawa yaitu, alkaloid dan saponin yang memiliki aktifitas sebagai antibakteri. Namun, pada penelitian ini senyawa yang mungkin terdapat pada Alang-alang adalah alkaloid. Hal ini karena senyawa alkaloid juga teridentifikasi pada uji fitokimia menggunakan pewarnaan *dragendorff*.

Sedangkan hasil uji fitokimia dengan pewarnaan *FeCl₃* didapatkan spot warna biru kehitaman pada fraksi 3-7 dengan nilai *Rf* yang juga tidak jauh berbeda pada masing-masing fraksi.

Senyawa yang dapat diidentifikasi pada pewarnaan $FeCl_3$ yaitu senyawa fenol. Sehingga dapat dikatakan bahwa tanaman herbal Alang-alang memiliki senyawa aktif fenol pada fraksi 3-7.

Pada hasil uji fitokimia dengan pewarnaan *dragendorff* pada fraksi semi polar (F1-F10) ekstrak metanol Alang-alang menghasilkan spot berwarna kuning sampai kuning keemasan pada fraksi 1-8. Masing-masing fraksi tersebut juga memiliki nilai R_f yang tidak jauh berbeda. Pada pewarnaan *dragendorff* dapat mengidentifikasi senyawa yaitu senyawa aktif alkaloid, sehingga dapat dikatakan bahwa tanaman herbal Alang-alang pada fraksi 1-8 memiliki senyawa aktif alkaloid. Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa herbal Alang-alang mengandung senyawa yaitu, alkaloid dan fenol. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa tanaman herbal Alang-alang memiliki kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, fenol dan tanin²⁶. Sedangkan senyawa kimia yang bersifat antibakteri adalah cinnamic acid, coumarin, methoxybenzoic acid dan methoxyflavone²⁷.

KESIMPULAN

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

1. Fraksi 1 sampai 10 secara tunggal tidak dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*.
2. Pada F1 sampai F8 memiliki kandungan senyawa Alkaloid dan pada fraksi 3 sampai 7 selain memiliki kandungan senyawa Alkaloid juga mengandung senyawa Fenol.
3. Interaksi F1 dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol pada *S. aureus* memiliki daya hambat yang bersifat potensiasi.
4. Interaksi F1 dengan Kloramfenikol pada *E. coli* memiliki daya hambat yang bersifat antagonis.

SARAN

Saran untuk mengembangkan penelitian ini lebih lanjut adalah :

1. Melakukan pemisahan senyawa metabolit sekunder Alang-alang (*Imperata cylindrica*) yang menghasilkan pure compound.
2. Melakukan penelitian lanjutan dari penelitian ini dengan menggunakan uji *sreening* fitokimia yang lebih spesifik pada turunan dari senyawa aktif yang terkandung pada fraksinasi semi polar F1-10 Alang-alang (*Imperata cylindrica*).
3. Melakukan penelitian lanjutan tentang penggunaan Alang-alang yang dapat memicu terjadinya *multidrug-resistant* (MDR).

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah

mendanai penelitian dan kepada dr. Rahma Triliana, M.Kes, PhD sebagai *peer reviewer* pada hasil penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. The World Medicine Situation 2011 3ed. Rational Use of Medicine. Geneva. 2011. 1; 4-9.
2. Kemenkes RI. Pedoman Penggunaan Antibiotik. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 2011.
3. WHO. The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance Options for action. Geneva. 2012.
4. Kemalputri D.W., Jannah S.N., Budiharjo A. Deteksi MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) Pada Pasien Rumah Sakit Dengan Metode Maldi-Tof MS dan Multiplex PCR. **Jurnal Biologi**. 2017. 6; 51-61.
5. Depkes RI. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Tentang Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik. Jakarta. 2011. 2; 5-7.
6. Jayaraman, P., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., Tang, T. H., & Sakharkar, K.R. Activity and Interaction of Antibiotic and Phytochemical Combination Against Pseudomonas aeruginosa. **International Journal of Biological Sciences**; 2010. 6; 556-568.
7. Choirunnisa dan Sutjiatmo. Pengaruh kombinasi ekstrak etanol herba *cecendet* (*Physalis angulata* L.) dengan beberapa antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae*. Cimahi: Universitas Jenderal Achmad Yani. 2017. 5; 50-55.
8. Koh K.H., Tham F.Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum sensing inhibitors activity. **Journal of Microbiology Immunology Infection**; 2011. 44; 144-148.
9. Anugraha D., Rio R., Faisal. Efek Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Alang-alang dengan Antibiotik Amoxicillin, Chloramphenicol dan Cotrimoxazole terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Malang; Skripsi FK UNISMA. 2018.
10. Kohanski H.A., Dwyer D.J. and Collins J.J. How Antibiotics Kill Bacteria from Targets to Network. **Macmillan Publishers Limited**. Nature Reviews Microbiology. 2010. 8; 423-435.
11. Catinca A., Clara A., Trifan A., Adrian S., Brebu M., Miron A. Interaction Between Cardamom Essential Oil and Conventional Antibiotic Against *Staphylococcus Aureus* Clinical Isolates. Romania; University of Medicine and Pharmacy Lasi. 2014.
12. Parija, Subhash Chandra. Textbook of Microbiology & Immunology. 2nd Edition. India: Elsevier. 2009; 67.
13. Ziaei-Daroukalei N., Ameri M., Zhraei-Salehi T *et al.* AZDAST the new horizon in antimicrobial

- synergism detection. USA: **National Center for Biotechnology Information**. 2016.
14. A.E. Brechú-Franco, G. Laguna-Hernández, I. De la Cruz-Chacón, A.R. González-Esquinca. In situ histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. seeds during germination. **European Journal Of Histochemistry**. 2016. 60; 2568.
 15. J.B., Harbone. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (alih bahasa: Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro). Bandung: ITB. 2006. 92-104.
 16. Jork H., Funk W., Fischer W., & Wimmer H. Thin Layer Chromatography Reagent and Detection Metode. New York; 1990.
 17. Fall, Reynolds J., Colledge R., Kirby-Bauer Test for Antibiotic Susceptibility. **BIOL**. 2011. 24;1-2.
 18. Wardati F.B., Zainul F., Rio R. Efek Daya Hambat Kombinasi Fraksi F33-F37 *E.scabr* (Tapak Liman) dengan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*. Malang: Skripsi UNISMA. 2019.
 19. Cushnie T.P., Cushnie B., Lamb A.J. Alkaloid: An Overview of Their Antibacterial, Antibiotic-Enhancing and Antivirulence Activities. University of Mahasarakham. Thailand. 2014.
 20. Davidson P.M., Branden A.L. Antimicrobial Activity of Non-Halogenated Phenolic Compounds. *Journal of Food Protection*. 1980. 44:623-632.
 21. Milton R.J. Salton dan Kwang-Shin Kim. Structure of Bacteria. Departement of Bacteriology University of Wisconsin-Madison. USA. 2010.
 22. Maddison, Jill. E, Stephen W.P, David, B.C. Small Animal Clinical Pharmacology 2nd edition. WB Saunders. USA. 2008.
 23. Hirakawa H, Inazumi Y, Masaki T, Hirata T, Yamaguchi A. *Mol Microbiol*. 2005. 55:1113–26. [PubMed: 15686558].
 24. Recio JF, Walas F, Federici L, Pratap JV. A model of a transmembrane drug efflux pump from Gram negative. **J Antimicrob Agents and Chemother**. [Internet]. 2008. 47; 139-44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581607>
 25. Purwoko, Tjahjadi. Fisiologi Mikroba. Jakarta: Bumi Aksara. 2007.
 26. Sudarsono, D. Gunawan, S. Wahyono, I.A. Donatus, dan Purnomo. Tumbuhan Obat II. Pusat Studi Obat Tradisional UGM. Yogyakarta. 2002.
 27. Liu R, H., Chen S, S., Ren G., Shao F., Huang H, I. Phenolic Compounds from Roots of *Imperata cylindrical* var. major. **Chinese Herbal Medicines**. China. 2013.