

**Efek Penambahan Fraksi Semi Polar (F15-F19) Ekstrak Metanol Tapak Liman Pada Daya Hambat Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.**

Nurma Alifia R, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah\*  
Fakultas kedokteran Universitas Islam Malang  
Email : [riorisandiansyah@unisma.ac.id](mailto:riorisandiansyah@unisma.ac.id)

**ABSTRAK**

**Pendahuluan:** *Elephantopus scabr linn* mengandung senyawa yang bersifat antibakteri. Pemberian herba dengan antibiotik akan lebih meningkatkan kerja antibiotik. Pada penelitian sebelumnya *Elephantopus scabr linn* masih berupa crude ekstrak, sehingga pada penelitian ini dilakukan pemisahan senyawa *E.scabr* menjadi fraksi semi polar untuk mengetahui aktivitas antibiotiknya dan senyawa yang terkandung didalamnya.

**Metode:** Ekstrak metanol serbuk tapak liman difraksinasi menggunakan fase diam silica gel dan fase gerak 75 ml etil asetat: 25 methanol. Uji fitokimia dengan spray *dragendorff*,  $FeCl_3$  dan *Formaldehyde* pada kromatografi Lapis Tipis. Interaksi antara antibiotik dengan herbal dinilai berdasarkan metode AZDAST dan penilaian daya hambat menggunakan metode *Kirby-Bauer*.

**Hasil:** Ditemukan 5 fraksi semi polar yaitu f15-f19. Fraksi 15 mengandung senyawa alkaloid, namun fraksi 16-19 mengandung senyawa fenol dan alkaloid sebagai antibakteri. Secara tunggal fraksi 16 memiliki zona bening terhadap *S.aureus* sebesar  $6,66 \pm 0,57$  mm. Pada Uji Kombinasi Fraksi 18, 19 menurunkan aktivitas amoxicillin pada *S.aureus*. Uji kombinasi fraksi 16-19 juga menurunkan aktivitas chloramphenicol pada *S.aureus*.

**Kesimpulan:** Fraksi 16 ekstrak metanolik tapak liman bersifat sinergistik dengan amoksisilin terhadap *S.aureus*.

**Kata Kunci:** Fraksi Semi Polar, *Elephantopus scabr L*, *S.aureus*, *E.coli*.

**Effects of Reeds Methanol Extract Semi Polar Fraction (F15-F19) Addition on Amoxicillin and Chloramphenicol Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.**

Nurma Alifia R, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah\*  
Fakultas kedokteran Universitas Islam Malang  
Email : [riorisandiansyah@unisma.ac.id](mailto:riorisandiansyah@unisma.ac.id)

**ABSTRACT**

**Introduction:** *Elephantopus scabr linn* contains various compounds which have antibacterial activity. The addition of antibiotic with herbs may increase antibiotic activity. However previous studies on *Elephantopus scabr linn* was in the form of crude extract. Therefore, this study separates compounds these into Semi polar fraction to determine the antibiotic activity and what compounds were contained therein.

**Methods:** Methanol extract was fractionated using silica gel stationary phase and mobile phase 75 ml of ethyl acetate: 25 ml of methanol. Phytochemical test were carried out with *dragendorff* spray,  $FeCl_3$  and *Formaldehyde* on Thin layer Chromatography. The interaction between herbs and antibiotics was assessed based on the AZDAST method and the inhibitory assessment using the *Kirby bauer* method.

**Result:** Five fractions (f15-f19) were obtained using fractionation. Fraction 15 contain alkaloids, and fraction 16-19 contains alkaloids and phenol. On a single test, fraction 16 had clear zones against *S.aureus* with a value  $6,66 \pm 0,57$  mm. In the combination test, fraction 18 and 19 had an antagonistic interaction with amoxicillin in *S.aureus*. Combination of fractions 16-19 had antagonistic interaction with chloramphenicol in *S.aureus*.

**Conclusion:** Fraction 16 of *Elephantopus Scabr Linn* methanolic extract was sinergistic with amoxicillin against *S.aureus*.

**Keywords:** Semi Polar Fraction, *Elephantopus scabr linn*, *S. aureus*, *E.coli*.

\*Correspondence :

Rio Risandiansyah

Faculty of medicine, University of Islam Malang

Address : JL.MT Haryono 193, Malang City, East Java, Indonesian, 65145

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

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi di Indonesia termasuk dalam peringkat sepuluh penyakit terbanyak penyebab sakit di Indonesia.<sup>1</sup> Banyaknya kasus infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* dapat ditangani dengan penggunaan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak rasional menyebabkan resistensi bakteri terhadap antibiotik.<sup>2</sup> Dilaporkan oleh Perhimpunan Dokter *Intensive Care* Indonesia (PERDICI) pada tahun 2014 bahwa, angka kematian infeksi berat (sepsis) di Indonesia akibat bakteri resisten mencapai 72%.<sup>3</sup>

Salah satu upaya untuk mengatasi masalah resistensi bakteri *S.aureus* dan *E.coli* terhadap antibiotik yaitu menggunakan tanaman herbal yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Selain digunakan secara tunggal tanaman herbal dapat digunakan secara bersama-sama dengan antibiotik.<sup>4</sup> Terdapat pula hasil pengamatan identifikasi senyawa ekstrak etanol daun *Elephantopus scabr Linn* menunjukkan bahwa terdapat kandungan alkaloid, steroid dan flavonoid. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri.<sup>5</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh Verryana pada tahun 2018 menggunakan ekstrak hasil dari *Elephantopus scabr Linn* yang masih berupa mixed compound. Menurut hasil penelitian tersebut didapatkan adanya kemungkinan bahwa tapak liman tidak terlalu berpengaruh dalam meningkatkan aktivitas antibiotik akan tetapi belum diketahui senyawa aktif apa saja yang berinteraksi didalamnya. Oleh karena itu penelitian ini akan melakukan fraksinasi terhadap tapak liman untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada pada tanaman tapak liman. fraksi-fraksi tersebut dikombinasi dengan amoxicillin dan kloramfenikol terhadap *S aureus* dan *E coli* yang bertujuan untuk mengetahui daya hambat dan kombinasi tersebut dengan uji *Zone of Inhibition* (ZOI).<sup>6</sup>

## METODE PENELITIAN

### Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif. Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental laboratorium *in vitro*, yang dilakukan untuk mengetahui efek dari ekstrak metanol tapak liman (*Elephantopus scabr linn*) yang dikombinasikan dengan antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol terhadap perubahan *Zone of Inhibition* (ZOI) kombinasinya pada bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari hingga Mei 2019, di laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Herbal Medik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

## Pembuatan Ekstrak Metanol Tapak Liman.

Pembuatan Ekstraksi Tapak Liman (*Elephantopus Scabr Linn*) dilakukan dengan metode maserasi yang dimulai dengan mempersiapkan simplisia dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Setiap metode ekstraksi, simplisia ditimbang dengan neraca digital sebanyak 200 gram dan direndam dengan 200 ml metanol 96 % di dalam Erlenmeyer yang dibagi kedalam 5 Erlenmeyer berukuran 500 ml dengan setiap Erlenmeyer menggunakan 40 gram simplisia dan 400 ml metanol 96 %. Erlenmeyer selanjutnya ditutup dengan aluminium foil dan diamkan selama 1 hari didalam *shaker water bath*. Setelah itu hasil ekstraksi di filtrasi dengan filter yang dibantu dengan vacuum dan filtrat yang dihasilkan kemudian dievaporasi dengan *rotary vacuum evaporator* sampai terpisah dengan pelarutnya. Ekstrak tersebut selanjutnya ditampung dalam gelas beker 250 ml (yang telah ditimbang) dan di masukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama 3 hari. Kemudian diamkan sampai menjadi ekstrak kental atau pasta, lalu ditimbang.

## Metode Fraksinasi Tapak Liman

Pada metode ini ekstrak tapak liman difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam resin silika gel dan fasa gerak yaitu pelarut etil asetat dan metanol, urutan susunan fraksi dari bawah ke atas yaitu kertas saring, glass wool, silika mengisi +2/3 kolom, campuran herbal 2 gram dengan silika 3 gram dan silika 1,5 gram. Setelah disusun, pelarut dimasukkan dalam kolom dengan urutan: 1) 50 ml etil , 2) 45 ml etil asetat : 5 ml metanol, 3) 37, 5 ml etil asetat : 12,5 ml metanol, 4) 25 ml etil asetat : 25 ml metanol, 5) 12,5 ml etil asetat : 37, 5 ml metanol dan 6) 50 ml metanol. Hasil fraksi yang di dapat ditampung di dalam vial yang berbeda untuk setiap warna yang berbeda.

### Kromatografi lapis Tipis

Uji kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan setelah ditemukan hasil fraksi untuk mengkonfirmasi hasil dari kromatografi kolom secara kualitatif, dimana fraksi-fraksi yang memiliki senyawa yang sama dijadikan satu fraksi. KLT dilakukan dengan menggunakan F15 Silica plate berukuran 5 cm x 5 cm

dengan eluen metanol-etil asetat (1:3). Plat KLT yng telah diaktivasi ditetesi dengan hasil fraksi menggunakan *yellow tip* sebanyak 50-100 $\mu$ . Penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan. Kemudian setelah kering plat KLT dimasukkan dalam chamber berisi eluen dan diamankan higgsa pelarut naik sampai batas garis atas plat.

#### **Metode Pembuatan Larutan Antibiotik.**

Mempersiapkan larutan antibiotik amoksisilin sebanyak 100 mg dilarutkan sampai 10 ml dengan aquades steril. Kemudian antibiotik kloramfenikol sebanyak 1000 mg yang dilarutkan sampai 10 ml aquades steril. Antibiotik yang sudah dilarutkan dijadikan sebagai stok bahan penelitian.

#### **Pembuatan Cawan Petri untuk Uji Bakteri dengan Metode Pour Plate**

Pada metode ini dimulai dengan melakukan preparasi inokulum menggunakan spektrofotometer. Beberapa koloni isolat bakteri dari media padat dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl 0,9 % steril menggunakan oshe steril hingga menjadi keruh, kemudian dilakukan vorteks. Dengan mikropipet sampel bakteri diambil sebanyak 3 ml dan ditaruh di dalam kuvet untuk dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Kemudian nilai absorbansi dicatat dan diencerkan dengan NaCl 0,9 % steril sesuai dengan rumus berikut, dengan target OD600nm adalah 0,2:

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

Kemudian media uji aktivasi antimikroba disiapkan dengan membuat media padat, lalu disterilkan menggunakan autoklav. Setelah steril suhu media diukur menggunakan termometer cahaya. Botol media digerakkan agar inokulum tercampur dengan rata. Media dituang ke dalam cawan petri sehingga mengisi setengah ketinggian cawan.

#### **Zone of Inhibition ( ZOI )**

Tahap yang dilakukan untuk melakukan uji ZOI yaitu dengan mempersiapkan biakan agar yang telah diinokulasi bakteri *E.coli* dan *S.aureus*, fraksi

herbal tapak liman serta antibiotik kloamfenikol dan amoksisilin yang telah diencerkan sesuai dosis yang ditentukan. Biakan agar yang telah berisi bakteri dilubangi dengan cork borer sebanyak 10 lubang, selanjutnya sampel yang diujikan dimasukkan sebanyak 30-50  $\mu$ l menggunakan mikropipet, biakan dengan kondisi setengah terbuka di dalam *laminar air flow* (LAF) / *Bio safety cabinet* (BSC) selama 30 menit sampai 1 jam. Kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Jika sampel yang diujikan tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri maka akan terbentuk sebuah zona bening (*clear zone*) disekeliling sumuran. Zona bening diukur menggunakan penggaris dengan satuan mm.

#### **Uji Fitokimia**

Pada Uji fitokimia yang dilakukan pertama kali yaitu menemukan kandungan alkaloid. KLT yang sudah ditutul fraksi ekstrak metanolik tapak liman (F15-F19) disemprot dengan larutan *dragendorff* dan secepatnya diamati dan dicatat perubahan warnanya. Selanjutnya yaitu menggunakan reagen *FeCl<sub>3</sub>* yang digunakan untuk mendeteksi adanya kandungan fenol KLT yang sudah disemprot dipanaskan 10 menit, kemudian dapat diamati dan dicatat perubahan warnanya. Jika terdapat perubahan warna menjadi hijau, merah dan hitam pekat meunjukkan adanya fenol. Reagen yang selanjutnya digunakan adalah *formaldehyde* yang dapat digunakan untuk mendeteksi kadungan steroid dan terpenoid. KLT yang telah disemprot didiamkan di suhu ruangan sampai mengering.

#### **Analisa Data Statistik**

Analisa hasil *Zone of Inhibition* (ZOI) tunggal dan kombuso diukur menggunakan penggaris dengan satuan mm dan untuk mendapat rata-rata dan standar deviasi dibuat menggunakan SPSS (*Statistical package for the social sciences*). Untuk melihat perbedaan yang signifikan antara ZOI tunggal dan kokibinasi dari setiap fraksi maka menggunakan uji statistik yaitu uji *Mann-Whitney Test* pada data yang tidak terdistribusi normal dan dengan *One Way Anova* pada data yang terdistribusi normal untuk mengetahui

perbandingan ZOI kombinasi dengan hasil ZOI tunggal.

Interpretasi hasil menurut metode AZDAST yaitu sinergis jika diameter zona bening yang terbentuk pada kombinasi herbal dan antibiotik (AB) lebih besar dari herbal tunggal (A) dan antibiotik tunggal (B) dan lebih kecil atau lebih besar dari Herbal kombinasi (AA) dan / atau antibiotik kombinasi (BB). Aditif jika AB sama dengan AA atau BB. Antagonist jika AB lebih kecil dari A atau B. Potensial jika salah satu dari A atau B sama dengan nol dan AB lebih besar dari A & B dan lebih kecil atau dari AA dan / atau BB. Tidak bisa dibedakan (*Not distinguishable*) jika AB sama dengan salah satu A atau B.

## HASIL PENELITIAN

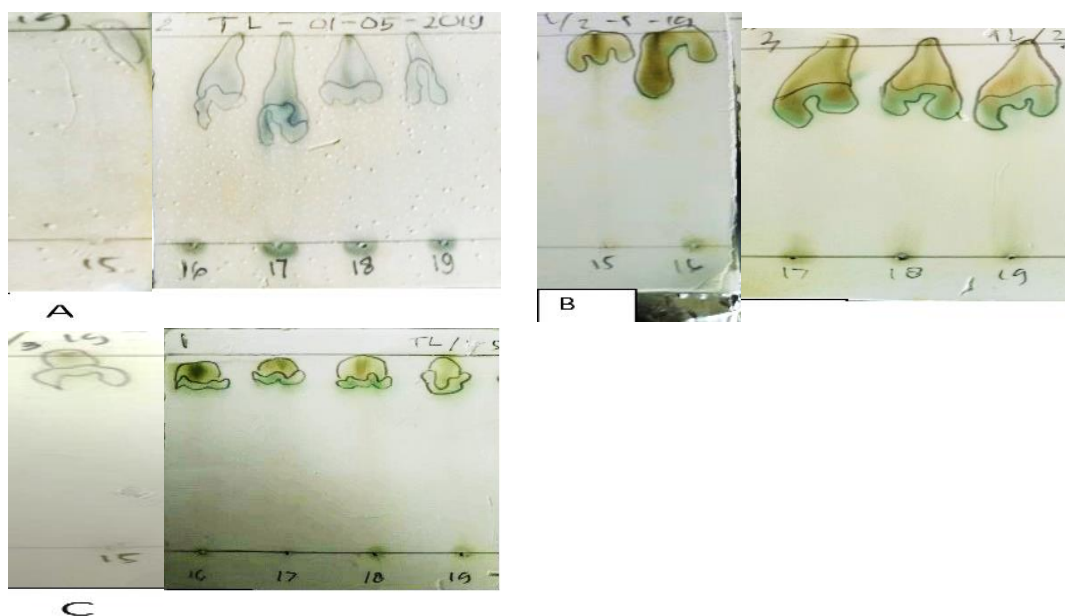
### Hasil Uji Fitokimia

*Screening* fitokimia merupakan proses identifikasi senyawa aktif yang terdapat pada fraksi tapak liman menggunakan suatu pereaksi warna dengan melihat reaksi pengujian perubahan warna untuk memberikan gambaran suatu senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti. Uji *Screening* fitokimia dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) *spray* pada fraksi 15-19 tapak liman yang bisa dilihat pada

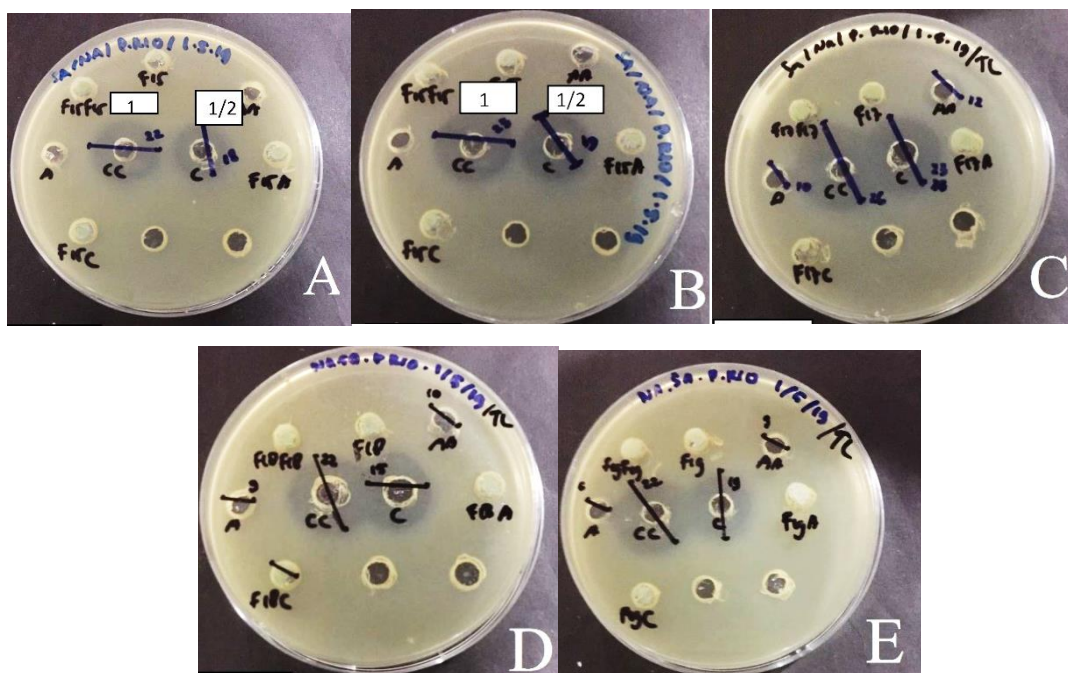
Hasil uji fitokimia pada fraksi 15-19 ditemukan spot dengan *Rf* yang sama yakni spot berwarna orange pada pewarnaan *dragendorff*, sehingga spot ini diduga merupakan alkaloid. Selain alkaloid pada F16-F19 juga ditemukan senyawa fenol dengan spot *Rf* yang sama atau hampir sama.<sup>7</sup> Namun pada fraksi 15 tidak ditemukan senyawa fenol.

### Hasil Pengukuran Zone of Inhibition (ZOI) Tapak liman secara tunggal dan kombinasi dengan Antibiotik terhadap Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

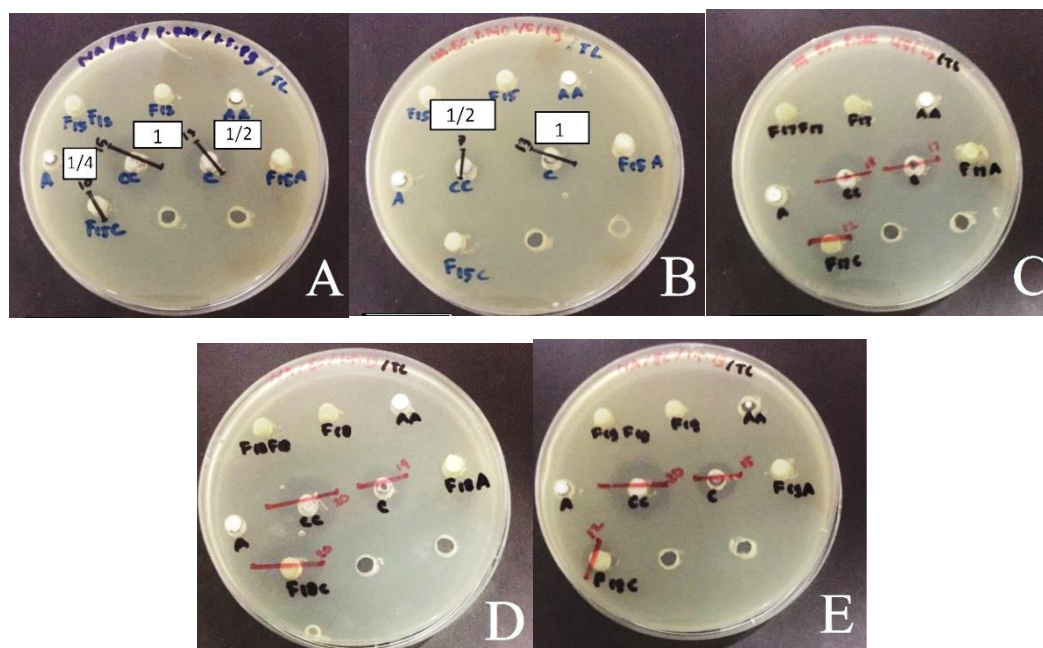
Pengukuran *Zone of inhibition* (ZOI) dilakukan menggunakan penggaris bersatuan milimeter yaitu mengukur zona bening (clear zone) yang terbentuk disekitar sumuran yang menandakan adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada perlakuan tersebut. Hasil pengukuran zona inhibisi ini dapat digunakan untuk mengetahui seberapa kuatnya suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini dilakukan perbandingan diameter antara antibiotik tunggal, herba tunggal dan kombinasi antibiotik dengan herbal. Hasil Pengujian pada bakteri *S.aureus* didapatkan seperti pada **Gambar.2** dan **Tabel. 1**



**Gambar 1.** Hasil KLT Spray pada Fraksi 15-19 Tapak Liman; A. KLT spray fraksi 15-19 dengan reagent  $FeCl_3$ ; B. KLT spray fraksi 15-19 dengan reagent *dragendorff* C. KLT spray fraksi 15-19 dengan reagent *formaldehyde* (kualitas gambar dengan peningkatan kontras).



**Gambar 2.** Hasil Pengujian Bersama ZOI Fraksi Tapak Liman dan Antibiotik pada Bakteri *S.aureus*. **A.** Fraksi 15 ekstrak metanol Tapak liman, F15F15= Fraksi 15 30  $\mu$ , F15= fraksi 15 dosis 15  $\mu$ , AA = Amoksisilin dosis 30  $\mu$ , A= Amoksisilin dosis 15  $\mu$ , CC= Kloramfenikol dosis 30  $\mu$ , C=Kloramfenikol dosis 15  $\mu$ ,F15A= Kombinwdasi fraksi 15 dan amoksisilin, F15C=Kombinasi fraksi 15 dan Kloramfenikol, **B.** Fraksi 16 ekstrak metanol Tapak Liman ; **C.** fraksi 17 ekstrak metanol Tapak liman; **D.** Fraksi 18 ekstrak metanol tapak liman; **E.** Fraksi 19 ekstrak metanol Tapak liman;



**Gambar 2.** Hasil Pengujian Bersama ZOI Fraksi Tapak Liman dan Antibiotik pada Bakteri *E.coli*. **A.** Fraksi 15 ekstrak metanol Tapak liman, F15F15= Fraksi 15 30  $\mu$ , F15= fraksi 15 dosis 15  $\mu$ , AA = Amoksisilin dosis 30  $\mu$ , A= Amoksisilin dosis 15  $\mu$ , CC= Kloramfenikol dosis 30  $\mu$ , C=Kloramfenikol dosis 15  $\mu$ ,F15A= Kombinasi fraksi 15 dan amoksisilin, F15C=Kombigtgnasi fraksi 15 dan Kloramfenikol, **B.** Fraksi 16 ekstrak metanol Tapak Liman ; **C.** fraksi 17 ekstrak metanol Tapak liman; **D.** Fraksi 18 ekstrak metanol tapak liman; **E.** Fraksi 19 ekstrak metanol Tapak liman;

**Tabel 1.** Rerata Dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Pengujian Fraksi Tapak Liman secara tunggal dan kombinasi dengan Antibiotik terhadap Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*.

Fraksi	Sampel	Rerata (mm) ± SD	Jenis Interaksi	Rerata (mm) ± SD	Jenis interaksi
F15	F15	0 ± 0		0 ± 0	
	C	0 ± 0		8,66±0,57	
	A	0 ± 0		0 ± 0	
	F15C	8,66±0,57		0 ± 0*c	
	F15A	0 ± 0		0 ± 0*c	
	F15F15	0 ± 0	<i>Not distinguishable</i>	0 ± 0	<i>Not distinguishable</i>
	CC	23±1,00		9,33±0,57	
	AA	0 ± 0		0 ± 0	
F16	F16	6,66±0,57		0 ± 0	
	C	19,66±0,57		4±6,92	
	A	7,33±0,57		0 ± 0	
	F16C	7,66±0,57		9,33±8,14	
	F16A	11 ± 1	<i>Sinergis dengan amoksisilin</i>	0 ± 0	
	F16F16	6,66±0,57		0 ± 0	<i>Not distinguishable</i>
	CC	23,66±2,3	<i>Antagonis dengan kloramfenikol</i>	9 ± 7,93	
	AA	9,33±1,15		0 ± 0	
F17	F17	0 ± 0		0 ± 0	
	C	21,66±1,15		9,66±8,5	
	A	13 ± 4,35		0 ± 0	
	F17C	0 ± 0		16±1	
	F17A	0 ± 0*c		0 ± 0	
	F17F17	0 ± 0	<i>Antagonis</i>	0 ± 0	<i>Not distinguishable</i>
	CC	24,66±1,15		14,33±5,13	
	AA	11,33±0,57		0 ± 0	
F18	F18	0 ± 0		0 ± 0	
	C	17,66±2,5		7,66±7,09	
	A	8 ± 1		0 ± 0	
	F18C	8,66±1,15*c		14,66±0,57	
	F18A	0 ± 0		0 ± 0	<i>Not distinguishable</i>
	F18F18	0 ± 0	<i>Antagonis</i>	0 ± 0	
	CC	20,66±2,3		16,33±3,05	
	AA	10,66±1,15		0 ± 0	
F19	F19	0 ± 0		0 ± 0	
	C	21,33±2,08		4,33±7,5	
	A	6,66 ± 0,57		0 ± 0	<i>Not distinguishable</i>
	F19C	0 ± 0		15,66±6,35	
	F19A	0 ± 0 *c		0 ± 0	
	F19F19	0 ± 0	<i>Antagonis</i>	0 ± 0	
	CC	24±1,73		4,66±8,08	
	AA	10,33±1,52		0 ± 0	

**Keterangan :** FxFx= uji ZOI tunggal fraksi tapak liman dosis 30μ; A= uji ZOI tunggal amoksisilin dosis 15μ, FxA= uji ZOI kombinasi fraksi tapak liman dan amoksisilin; CC= uji ZOI tunggal Kloramfenikol dosis 30μ; C= uji ZOI tunggal Kloramfenikol dosis 15μ; FxC= uji ZOI kombinasi fraksi tapak liman dan Kloramfenikol. <sup>a</sup> berbeda signifikan terhadap amoksisilin (p<0,05). Nilai AA, CC dan FxFx disertakan secara lengkap di lampiran.

**Tabel 2** Hasil perhitungan Rf dan KLT spray

No. Fraksi	Kandungan Zat Aktif	Spray reagen	Warna	Rf
F15	Fenol (-)	<i>FeCl<sub>3</sub></i>	Biru Kehitaman (-)	0,88
	Alkaloid (+)	<i>Dragendorrf</i>	Orange (+) Hijau (+)	0,92
	Steroid dan turunannya / Terpenoid	<i>Formaldehyde</i>	Kecoklatan (+)	0,86 0,94
F16	Fenol (+)	<i>FeCl<sub>3</sub></i>	Biru Kehitama(+)	0,68 0,85
	Alkaloid (+)	<i>Dragendorrf</i>	Orange (+)	0,82
	Steroid dan turunannya/ Terpenoid	<i>Formaldehyde</i>	kecoklatan(+)	0,91 0,94
17	Fenol (+)	<i>FeCl<sub>3</sub></i>	Biru Kehitaman(+)	0,44 0,52 0,66
	Alkaloid (+)	<i>Dragendorrf</i>	Orange (+)	0,73 0,86
	Steroid dan turunannya/ Terpenoid	<i>Formaldehyde</i>	Kecoklatan(+)	0,88 0,94
18	Fenol (+)	<i>FeCl<sub>3</sub></i>	Biru Kehitaman (+)	0,68 0,82
	Alkaloid (+)	<i>Dragendorrf</i>	Orange (+)	0,84 0,86
	Steroid dan turunannya/ Terpenoid	<i>Formaldehyde</i>	kecoklatan (+)	0,86 0,91
19	Fenol (+)	<i>FeCl<sub>3</sub></i>	Biru kehitaman (+)	0,62 0,68 0,74
	Alkaloid (+)	<i>Dragendorrf</i>	Orange (+)	0,86 0,91
	Steroid dan turunannya/ Terpenoid	<i>Formaldehyde</i>	kecoklatan (+)	0,86 0,91

### Hasil Uji Zona Inhibisi Tunggal Fraksi 15-19 Tapak Liman Terhadap Bakteri *S.aureus*

Menurut gambar di atas fraksi 15,17,18,19 tidak didapatkan zona bening pada uji zoi tunggal antibiotik amoksisilin dan klormafenikol terhadap bakteri *S.aureus*. Namun pada fraksi 16 didapatkan zona bening  $6,66 \pm 0,57$  mm.

### Hasil Uji Zona Inhibisi Kombinasi Antara Fraksi 15-19 Tapak liman dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *S.aureus*

Pada Gambar 2 dan Tabel 1 diatas uji zona inhibisi kombhksanasi antara tapak liman denggn aoksisilin terhadap bakteri *S.aureus* didapatkan hasil fraksi 17 sampai fraksi 19 tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) setelah dilakukan uji statistik non parametrik *Mann whitney Test* sehingga memiliki interaksi antagonis. Fraksi 16 juga tidak signifikan ( $p > 0,05$ ), setelah dilakukan uji statistik non parametrik *Mann whitney Test*, tetapi kombiadgnasi antara fraksi *E.scabr* lebih besar dibandingkan dengan antibiotik tunggal sehingga memiliki interaksi *sinergis*. Sedangkan pada fraksi 15 memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.

Sedangkan pada uji zona inhibisi kimbinadagsi antara tapak liman dehgan kloramfenikol terhadap bakteri *S.aureus* didapatkan hasil yang tidak signifikan pada fraksi 16-19 sehingga memiliki interaksi antagonis. Namun pada fraksi 15 memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.

### Hasil Uji Zona Inhibisi Tunggal Fraksi 15-19 Tapak liman Terhadap Bakteri *E.coli*

Pada Gambar 2 terlihat hasil uji zoi tunggal pada amoksisilin maupun kloramfenikol terhadap *E.coli* tidak memiliki zona bening/ zona hambat.

### Hasil Uji Zona Inhibisi Kombinasi Antara Fraksi 15-19 Tapak Liman dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *E.coli*

Pada Gambar 2 terlihat bahwa hasil uji zoi tunggal pada herbal dan amoksisilin tidak memiliki zona inhibisi, baik dengan

dosis 30 $\mu$ l maupun 15 $\mu$ l. Pada uji zoi klmbinajhsgsi antara herbal dengan amoksisilin juga tidak memiliki zona inhibisi.

Pada Tabel 1 diatas menunjukkan uji kolmbnbinasi antara fraksi 15,16,17,18,19 tapak liman dan kloramfenikol pada *E.coli*. Hasil uji klonmbinasi antara frakssi 15-19 didapatkan hasil tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ ) pada uji statistik *Mann-Whitney test*, sehingga berdasarkan hasil diatas komghmbiasi fraksi 15-19 tapak liman denghn kloramfenikol memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.

## PEMBAHASAN

### Analisa Kandungan Senyawa Aktif Fraksi Semi Polar (F15-19) Tapak Liman.

Hasil uji fitokimia pada fraksi 15-19 ditemukan spot denjian *Rf* yang sama yakni spot berwarna orange pada pewarnaan *dragendorff*, sehingga spot ini diduga merupakan alkaloid. Selain alkaloid pada F16-F19 juga ditemukan senyawa fenol diongan spot *Rf* yang sama atau hampir sama.<sup>7</sup> Namun pada fraksi 15 tidak ditemukan senyawa fenol.

Pada bakteri *E.coli* fraksi 15 hingga fraksi 19 ekstrak metanolik *Elephantopus scabr Linn* tidak memiliki aktifitas antibiotik, karena tidak didapatkan zona hambat pada uji ZOI fraksi 15-19<sup>8</sup>.

Fraksi 16-19 mengandung senyawa aktif alkaloid dan fenol, namun fraksi 15 hanya mengandung senyawa aktif alkaloid saja. Terdapat fraksi yang memiliki senyawa aktif yang saling berinteraksi dpngan senyawa aktif lainnya. Fraksi tersebut merupakan fraksi 16 dengan fraksi 17 karena terdapat perbedaan jenis interaksi yaitu fraksi 16 bersifat sinergis dan fraksi 17 bersifat antagonis yang saling berinteraksi satu sama lain.

Terdapat senyawa aktif lain selain fenol dan alkaloid yang terkandung dalam *E.scabr* dapat berupa flavonoid, terpenoid, kumarin, kuinon, minyak atsiri<sup>13</sup>. Pada fraksi 15-19 *E.scabr* didapatkan senyawa aktif yang memiliki kepolaran berbeda-beda pada setiap fraksi berdasarkan perbedaan *Rf*. Berdasarkan hasil tersebut, proses fraksinasi ini dapat memisahkan senyawa aktif yang terkandung dalam *E.scabr* meskipun belum sempurna.

Terdapat beberapa spot pada hasil penelitian uji KLT spray yang diduga



mengandung senyawa aktif pada fraksi 15-19 *E.scabr*. Spot yang ditemukan pada KLT mengalami *tailing* sehingga dapat menyebabkan proses identifikasi menjadi lebih sulit. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor yakni kurang tepatnya pemilihan fasa gerak, 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 sempurna<sup>14</sup>

### **Daya Hambat Tunggal Fraksi Semi Polar (F15-19) Tapak Liman Terhadap Bakteri *S.aureus* dan *E.coli***

Pada fraksi yang diuji, mayoritas tidak memiliki zona hambat secara tunggal terhadap bakteri *S.aureus* maupun *E.coli*. Namun fraksi 16 memiliki daya hambat bakteri yang dikategorikan sedang terhadap *S.aureus* pada pemberian dengan dosis 30 µl. Hal ini diduga karena fraksi 16 memiliki dosis yang cukup besar atau adanya interaksi antar senyawa aktif didalamnya.<sup>15</sup> Fraksi 16 mempunyai senyawa aktif alkaloid.

Alkaloid diketahui bekerja rehin alkaloid/fenolik yang bersifat bioaktif memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri.<sup>9</sup> Kemampuan alkaloid dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat sintesis DNA<sup>10</sup>, juga dengan melepaskan adhesin asam lipoteikoat dari permukaan sel sehingga mengganggu permeabilitas membran.<sup>11</sup> Selain itu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan mengakibatkan terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna dan terjadi kematian sel karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding sel hanya meliputi membran sel.<sup>12</sup>

Pada uji antibiotik secara tunggal didapatkan bahwa amoksisilin memiliki efek antibiotik yang lebih sensitif terhadap *S.aureus* dan *E.coli* dibandingkan terhadap kloramfenikol. Kemudian pada Uji ZOI tunggal pada amoksisilin dan kloramfenikol didapatkan bahwa adanya daya hambat pada amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *S.aureus* yang lebih kuat dari pada terhadap *E.coli*. Hal tersebut karena terdapat perbedaan struktur pada dinding bakteri *S.aureus* dan *E.coli*, dimana *E.coli* merupakan bakteri gram

negatif yang memiliki dinding sel yang tersusun atas membran luar, peptidoglikan dan membran dalam, sedangkan pada *S.aureus* yang merupakan bakteri gram positif hanya terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tebal dan membran plasma. Sehingga pada bakteri gram negatif yang membran luarnya memiliki lapisan lipopolisakarida dan lebih kompleks tidak dapat ditembus oleh antibiotik.<sup>17</sup>

Lapisan lipopolisakarida yang dimiliki bakteri Gram negatif dapat berfungsi mencegah kerusakan sel terhadap enzim dan bahan kimia yang dapat merusak sel. Pada bakteri Gram negatif lapisan membran luar yang dimilikinya mencegah kerusakan sel bakteri, oleh karena enzim tersebut tidak dapat menembus lapisan membran luar.<sup>13</sup> Sehingga pada uji ZOI tunggal F15 hingga F19 yang dilakukan pada *E. coli* tidak memiliki zona hambat, sehingga tidak ada daya hambat terhadap bakteri *E. coli* pada uji ZOI tunggal F15 hingga F19.

Pada membran sel adanya senyawa alkaloid dari tanaman tapak liman antara bakteri *S.aureus* dan *E.coli*, namun belum diketahui jenisnya secara pasti. Selain alkaloid terdapat senyawa lain yaitu flavonoid, terpenoid, kumarin, kuinon, minyak atsiri.<sup>13</sup> Fenol memiliki beberapa derivat turunan yaitu quinone, flavonoid, flavone, simple phenol, phenolic acid, tanin dan cumarin.<sup>18</sup>

### **Daya Hambat Kombinasi Antara Fraksi Semi Polar (F15-19) Tapak Liman dengan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli***

Berdasarkan pengujian kombinasi antara fraksi tapak liman dan amoksisilin terhadap bakteri *S. aureus* dan data hasil penelitian yang telah diolah melalui SPSS dengan menggunakan metode AZDAST bahwa hasil kombinasi fraksi 16 tanaman tapak liman dengan antibiotik amoksisilin terhadap bakteri *S.aureus* memiliki interaksi sinergis pada uji ZOI tunggal, hal ini diduga karena fraksi 16 mengandung alkaloid yang diketahui bekerja secara intrasel.

Kombinasi antibakteri yang bekerja secara intrasel diketahui dapat berinteraksi sinergis dengan antibiotik yang bekerja pada dinding sel. Hal ini ditunjukkan antara amoksisilin dengan ciprofloksasin.<sup>16</sup> Kombinasi antara komponen epigallocatechin gallate yang terdapat pada tapak liman dan

antibiotik betalaktam (amoksisilin) terhadap *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* menghasilkan efek sinergis. Kedua komponen memiliki mekanisme kerja yang sama, yaitu menyerang peptidoglikan dalam dinding sel.<sup>24</sup> Mekanisme yang sama dapat menghasilkan hasil interaksi antara fraksi 16 dengan amoksisilin.

Pada fraksi 17-19 tanaman tapak liman dengan antibiotik amoksisilin terhadap bakteri *S.aureus* atau *E.coli* memiliki interaksi *antagonis*. Berdasarkan rerata dan *standart* deviasi kombinasi fraksi 17-19 *E.scabr* dengan amoksisilin pada *S.aureus*, memiliki potensi terhadap sifat *antagonis* karena hasil tersebut menunjukkan nilai yang menurun tetapi tidak signifikan. Hal tersebut menunjukkan adanya interaksi antara antibiotik dengan non-antibiotik. Fraksi 17-19 memiliki efek *antagonis* karena adanya ROS (*Reactive oxygen species*), perubahan pH atau terjadinya ionisasi. Kombinasi antara komponen *epigallocatechin gallat* yang merupakan turunan dari fenol (EGCG) yang terdapat dalam tapak liman memiliki aktifitas pada dinding sel dengan cara mengikat protein transporter.<sup>28</sup> Sehingga dari mekanisme tersebut diduga senyawa pada fraksi 16 menghambat masuknya kloramfenikol ke dalam sel bakteri untuk menuju sel target.

Antibiotik amoksisilin berinteraksi dengan bakteri *E.coli* akan meningkatkan pembentukan ROS. Mekanisme kerja dari amoksisilin sebagai salah satu dari beta laktam dan termasuk antibiotik bakterisidal yang dapat meningkatkan ROS dengan cara menghambat kompleks *electron transport chain* (ETC).<sup>23</sup> ROS dapat berasal dari salah satu komponen inflamasi yang muncul dari kerusakan jaringan dan otot yang termobilisasi dan memicu proses inflamasi.<sup>20</sup> Kemudian ROS yang terakumulasi di dalam sel akan berinteraksi dengan antioksidan yaitu glutathione. Glutathione akan berinteraksi dengan ROS dengan cara bertindak sebagai reseptor elektron dan menghidrolisis ROS.<sup>21</sup> Antioksidan berfungsi dapat menghambat dan menetralkan terjadinya reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas. Netralisir ini dilakukan dengan cara memberikan satu elektronnya sehingga menjadi senyawa yang lebih stabil atau terjadi reaksi terminasi dan reaksi-reaksi radikal berakhir atau stres oksidatif tidak terjadi pada sel.<sup>22</sup>

Stres oksidatif terjadi ketika keseimbangan antara oksidan dan antioksidan terganggu berupa akumulasi ROS atau deplesi dari antioksidan. Stres oksidatif terjadi ketika sel akan bereaksi dengan antioksidan melalui reaksi reduksi-oksidasi dengan mengaktifkan gen yang mengkode enzim pertahanan, faktor transkripsi dan protein struktural. Kadar ROS yang tinggi selain dapat mengakibatkan stress oksidatif juga dapat menyebabkan perubahan struktur DNA, modifikasi protein dan mengaktifkan faktor transkripsi yang diinduksi stres dengan cara meningkatkan produksi sitokin proinflamasi dan antiinflamasi.<sup>21</sup>

Sifat antagonistik dapat dilihat dengan interaksi ROS dengan antioksidan. Sedangkan pada fraksi 14 mengandung senyawa yaitu fenol dan alkaloid yang memiliki aktivitas lain sebagai antioksidan dengan cara kerja menghambat ROS.<sup>17</sup> Sehingga induksi dari amoksisilin terhadap ROS dihambat oleh aktivitas dari senyawa kimia dalam fraksi 17-19 yang kemudian menyebabkan terjadinya interaksi *antagonis*.

Sifat antagonistik dapat dilihat dengan interaksi ROS dengan antioksidan. Seperti pada antibiotik amoksisilin berinteraksi dengan bakteri *E.coli* akan meningkatkan pembentukan ROS, namun dengan antioksidan dalam tanaman tapak liman menyebabkan pembentukan ROS menurun, sehingga terjadi reaksi *antagonis* antara fraksi 17-19 tapak liman dengan amoksisilin maupun kloramfenikol terhadap bakteri *S.aureus*.<sup>19</sup> Kemudian karena adanya interaksi antar senyawa aktif yang terkandung dalam setiap fraksi.<sup>11</sup>

Sebab lain fraksi 15-19 tapak liman dengan antibiotik amoksisilin terhadap bakteri *E.coli* tidak mempunyai aktifitas antibakteri karena *E.coli* merupakan jenis bakteri gram negatif. Pada bakteri gram negatif memiliki membran luar terdiri atas lipopolisakarida yang berfungsi sebagai saringan yang tidak dapat ditembus oleh beberapa antibiotik.<sup>17</sup> Selain itu karena fraksi 15-19 mengandung senyawa alkaloid dan fenol yang dapat bekerja sebagai antioksidan. Dugaan bahwa interaksi yang terjadi memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menghambat pembentukan ROS sehingga menghasilkan interaksi *antagonis*.<sup>19</sup>

Hasil Pengujian daya hambat kombinasi fraksi 15-19 *E.scabr* dan antibiotik kloramfenikol terhadap *S.aureus* yaitu fraksi 15 menunjukkan hasil *Not distinguishable*.

Hal ini menunjukkan bahwa zona yang dihasilkan berasal dari efek antibiotik tanpa dipengaruhi efek dari fraksi *E.scabr*. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil *Not distinguishable* yaitu antibiotik amoksisilin yang digunakan tidak stabil karena dilarutkan dengan pelarut air. Penyebab lainnya karena pemakaian di suhu ruang yang terlalu lama dan tidak dilakukannya pengeringan terlebih dahulu pada hasil fraksi sebelum dilakukannya uji ZOI tunggal sehingga tidak dapat melihat efek dosis dari fraksi yang akan digunakan untuk uji ZOI kombinasi.

Berdasarkan hasil rerata dan *standart* deviasi kombinasi fraksi 15-18 dengan kombinasi fraksi 16-19 *Elephantopus scabr Linn* dengan kloramfenikol pada *S.aureus*, memiliki potensi terhadap sifat antagonis. Namun berdasarkan rerata dan standar deviasi fraksi 15 dan 19 menunjukkan bahwa uji kombinasi tidak berbeda signifikan, sehingga didapatkan hasil *not distinguishable*. Sedangkan pada kombinasi fraksi 15-19 tapak liman dengan kloramfenikol pada *E.coli* memiliki jenis interaksi *not distinguishable*, namun berdasarkan rerata dan standar deviasi fraksi 15 menunjukkan bahwa uji kombinasi signifikan, namun *antagonist* Hal ini dapat terjadi karena adanya interaksi antar senyawa aktif yang terkandung dalam setiap fraksi dan rendahnya konsentrasi dalam proses fraksinasi.

### KESIMPULAN

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Fraksi semi polar F16 dari ekstrak metanolik *Elephantopus scabr Linn* secara tunggal memiliki zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* sebesar  $6,66 \pm 0,57$  mm
2. Fraksi semi polar F15-F19 dari ekstrak metanolik *Elephantopus scabr Linn* dapat menurunkan zona hambat antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol dibandingkan dengan antibiotik tunggal pada bakteri *S. aureus*
3. Fraksi 16-19 *E.scabr* didapatkan 2 senyawa aktif yaitu fenolik dan alkaloid. Fraksi 15 hanya mengandung senyawa alkaloid saja.

### SARAN

Saran untuk meningkatkan dan mengembangkan penelitian ini lebih lanjut adalah:

1. Melakukan isolasi dan identifikasi senyawa aktif pada F15-19 *E.scabr*.
2. Melakukan uji DPPH untuk menguji antioksidan.
3. Melakukan uji Ph untuk mengetahui tingkat keasaman.
4. Melakukan uji FICI dan FBCI pada Fraksi 16, 18 *E.scabr*.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada unit laboran yang telah membantu menyiapkan alat, IOM yang telah memberikan dana untuk penelitian ini, serta tak lupa untuk pihak KPPSM yang telah membantu dalam mengatur jadwal dan kelancaran ujian.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Grace, Pierce A, Neil R. Borley. *Glance Ilmu Bedah*. edisi ketiga. Jakarta: Erlangga. 2007; 40-41.
2. Depkes RI. *Mari bersama Atasi Antimikroba*, Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 2016.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia *Pengendalian Resistensi Antimikroba jadi perhatian dunia*. 2016
4. Ainiah. *Efek Ekstrak Teh Hijau (Camellia sinensis L) Dalam Memodulasi Aktivitas Amoksisilin Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus*. Makassar. 2018
5. Nonchi, F. Y., Rusli, dan A., Abidah, *Antimikroba ekstrak etanol daun tapak liman (Elephantopus scabr L.) dengan menggunakan metode klt bioautografi*. JF FIK UINAM. 2(4). 2014.
6. Parekh, J., Nair, R., Chanda, S. *Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity*. Indian J. Pharmacol., 2005; 37: 408-409.
7. Samuel G. Levine. *Journal of Chemical Education*. 72(1), A4. 1996. Doi: 10.1021/ed073pA4
8. Harborne, J.B. *Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Alih bahasa Kosasih Padmawinata. ITB Bandung. 1987; Hal 1-107

9. Pfoze, N. L., Kumar, Y., Myrboh, B., Bhagobaty, R. K., dan Joshi, S. R. In vitro Antibacterial Activity of Alkaloid Extract from Stem Bark of Mahonia manipurensis Takeda. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011; 5(5): 859-861.
10. Schmeller, T., Latz-Brüning, B., dan Wink, M. . Biochemical Activities of Berberine, Palmatine and Sanguinarine Mediating Chemical Defence Against Microorganisms and Herbivores. *Phytochemistry*, 1997; 44(2): 257-266.
11. Rubiyanto Dwiarto. Metode Kromatografi Prinsip Dasar, Praktikum Dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi, Penerbit deepublish, Yogyakarta, 2017.
12. Cowan, M.M., Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews* .1999; Vol. 12, No. 4 : 564-82.
13. Dalimartha, S. Atlas Tumbuhan Obat Jilid 6. Jakarta: PT Pustaka Bunda.2009; 30-32
14. Davis, W. W. dan Stout, T. R. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Applied Microbiology*. 22 (4): 659-665.
15. Pratiwi. Mikrobiologi Farmasi. Jakarta: Erlangga.2008
16. Bollenbach, Tobias. Antimicrobial interactions: mechanism and implications for drug discover and resistance evolution. Elsevier. 2015; 27:1-9
17. Katzung, B.G., Masters, S.B. dan Trevor, A.J., 2014. Farmakologi Dasar & Klinik, Vol.2, Edisi 12. Editor Bahasa Indonesia Ricky Soeharsono et al., Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
18. Cowan, Marjorie Murphy. Products as Antimicrobial Agents *Clinical Microbiology revies*. 1999; 12(4), 564-582
19. Hanani, Endang M dan Ryany Sekarin. Identifikasi senyawa antioksidan Dalam spons callyspongia sp Dari kepulauan seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vol II, No.3.2005;127-133. ISSN:1693-9883.
20. Kerksick C dan Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and nacyl- cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal Of The International Society Of Sport Medicine*. 2005; 2(2):38-44.
21. Townsend, A.R., R.W. Howarth, F. A. Bazzaz, M. S. Booth, C.C. Cleveland, S. K. Collinge, A. P. Dobson, P. R. Epstein, E. A. Holland, D. R. Keeney, M. A. Mallin, C. A. Rogers, P. Wayne, dan A. H. Wolfe. Human health effects of a changing global nitrogen cycle. *Front Ecol Environ*. 2003; 1(5): 240-246.
22. Zheng W. and Wang S.Y., Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J.Agric.Food Chem*. 2009. 49 (11) : 5165-70, ACS Publications, Washington D.C.
23. Kalghatgi, S., Catherina S., James C.C., Marc L., Antibiotics Affect Mitochondria in mammalian cells. *Sci Transl Med*. 2013. Vol.5.
24. Ziaei-Daroukalei N, Ameri M, Zahraei-Salehi T, Ziaei-Daroukalei O, Mohajer-Tabrizi T, Bornaei L. AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. Elsevier. 2016; 3: 43-52
25. Choirunnisa, A., A.B. Sutjiatmo, Pengaruh kombinasi ekstrak etanol herba cecendet (*Physalis angulata l.*) dengan beberapa antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumonie*. 2017; 5(2), 50-55
26. Wardati, Firsania Bunga, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah. Efek Daya Hambat Kombinasi Fraksi F33-F37 *E.scabr* ( Tapak Liman) dengan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*. Malang: UNISMA. Unpublished.