

Combination Activity of Ethanolic Extract of Kersen Leaves (*Muntingia calabura* L.) and Chloramphenicol Against *Salmonella typhi*

Aktivitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) dan Kloramfenikol Terhadap *Salmonella typhi*

Shafira Arifah Maharani ^a, Rima Munawaroh ^{a*}

^a Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

*Corresponding Authors: rima.munawaroh@ums.ac.id

Abstract

Background: Typhoid fever, caused by *Salmonella typhi*, remains a significant health burden. Chloramphenicol is a first-line antibiotic for its treatment; however, increasing bacterial resistance necessitates alternative therapeutic strategies. Combining antibiotics with natural compounds is a potential approach to overcome resistance and reduce antibiotic doses. Kersen leaves (*Muntingia calabura* L.) have been reported to contain bioactive compounds with antibacterial properties. **Objective:** This study aimed to evaluate the *in vitro* interaction between ethanolic extract of kersen leaves and chloramphenicol against *Salmonella typhi* using the checkerboard assay method. **Methods:** The ethanolic extract was obtained through maceration. Phytochemical constituents were analyzed qualitatively using tube tests and Thin-Layer Chromatography (TLC) with silica gel GF254 as the stationary phase and a chloroform:methanol (8:2 v/v) mobile phase. The antibacterial activity, expressed as Minimum Inhibitory Concentration (MIC), was determined for both the single extract and chloramphenicol using the microdilution method with resazurin indicator. The interaction between the two agents was assessed using the checkerboard assay, and the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was calculated. **Results:** Phytochemical screening revealed that the ethanolic extract of kersen leaves contained alkaloids, steroids, flavonoids, tannins, and saponins. The MIC value of chloramphenicol alone was 19.5 µg/mL, while the extract alone showed an MIC of >1000 µg/mL against *S. typhi*. The checkerboard assay results indicated an increase in the MIC of chloramphenicol in combination with the extract; however, the FICI value could not be definitively determined due to the inability to establish the extract's MIC in the combination. **Conclusion:** The ethanolic extract of kersen leaves contains various secondary metabolite groups. While chloramphenicol exhibited antibacterial activity, the extract alone did not show inhibitory activity at the tested concentrations. The combination test suggested a potential alteration in the effectiveness of chloramphenicol, but the interaction type (synergistic, additive, indifferent, or antagonistic) could not be conclusively classified. Further investigation using fractionated or isolated compounds from the leaves is recommended.

Keywords: Kersen Leaves, Antibacterial, *Salmonella typhi*, Checkerboard Assay

Abstrak

Latar Belakang: Demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* masih menjadi beban kesehatan yang signifikan. Kloramfenikol merupakan antibiotik lini pertama untuk pengobatannya, namun peningkatan resistensi bakteri menuntut strategi terapi alternatif. Kombinasi antibiotik dengan senyawa alam merupakan pendekatan potensial untuk mengatasi resistensi dan mengurangi dosis antibiotik. Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dilaporkan mengandung senyawa bioaktif dengan sifat antibakteri. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi interaksi *in vitro* antara ekstrak etanol daun kersen dan kloramfenikol terhadap *Salmonella typhi* dengan metode *checkerboard assay*. **Metode:** Ekstrak etanol diperoleh melalui maserasi. Kandungan fitokimia dianalisis secara kualitatif menggunakan uji tabung dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

dengan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak kloroform:metanol (8:2 v/v). Aktivitas antibakteri, dinyatakan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), ditentukan untuk ekstrak tunggal dan kloramfenikol menggunakan metode mikrodilusi dengan indikator resazurin. Interaksi antara kedua agen dinilai dengan *checkerboard assay*, dan *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) dihitung. **Hasil:** Skrining fitokimia mengungkapkan bahwa ekstrak etanol daun kersen mengandung alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, dan saponin. Nilai KHM kloramfenikol tunggal adalah 19,5 µg/mL, sedangkan ekstrak tunggal menunjukkan KHM >1000 µg/mL terhadap *S. typhi*. Hasil *checkerboard assay* menunjukkan peningkatan KHM kloramfenikol dalam kombinasi dengan ekstrak; namun, nilai FICI tidak dapat ditentukan secara definitif karena tidak dapat ditetapkannya KHM ekstrak dalam kombinasi tersebut. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol daun kersen mengandung berbagai golongan metabolit sekunder. Meskipun kloramfenikol menunjukkan aktivitas antibakteri, ekstrak tunggal tidak menunjukkan aktivitas hambat pada konsentrasi yang diuji. Uji kombinasi mengisyaratkan potensi perubahan efektivitas kloramfenikol, tetapi jenis interaksinya (sinergis, aditif, indifferent, atau antagonis) tidak dapat diklasifikasikan secara pasti. Investigasi lebih lanjut menggunakan fraksi atau senyawa terisolasi dari daun disarankan.

Kata Kunci: Daun Kersen, Antibakteri, *Salmonella typhi*, *Checkerboard Assay*.



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Article History:

Received: xxxxx,
Revised: 29/01/2026,
Accepted: 30/01/2026,
Available Online : 30/01/2026.

QR access this Article



<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v9i1.1299>

Pendahuluan

Demam tifoid ialah penyakit infeksi yang diakibatkan mikroorganisme *Salmonella typhi*. Bakteri ini mampu menginfeksi manusia melalui konsumsi makanan yang tercemar dengan kotoran maupun kotoran manusia dari pengidap demam tifoid sehingga bakteri dapat masuk dalam saluran pencernaan [1]. Kejadian demam tifoid di Indonesia memiliki prevalensi sebanyak 1,6% dan menempati peringkat kelima pada penyakit infeksius yang dapat menyerang seluruh kelompok umur serta menempati peringkat kelima belas dalam penyebab kematian yang dialami pada keseluruhan umur di Indonesia [2].

Penanganan demam tifoid di Indonesia pada dasarnya memanfaatkan terapi antibiotik. Antibiotik utama yang digunakan dalam demam tifoid salah satunya ialah kloramfenikol. Permasalahan penggunaan kloramfenikol untuk saat ini yaitu banyaknya kasus resistensi bakteri *S. typhi* terhadap antibiotik tersebut, hal terjadi dikarenakan adanya penggunaan kloramfenikol yang tidak rasional [3]. Dengan demikian, dibutuhkan sebuah alternatif guna menanggulangi kejadian resistensi. Salah satu strategi yang dapat diterapkan yaitu mengombinasikan antibiotik dengan bahan alam.

Kombinasi antibiotik dengan bahan alam yang mengandung agen antibakteri mampu dimanfaatkan menjadi terapi penanganan terhadap infeksi yang diakibatkan bakteri. Kombinasi tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengurangi dosis dari antibiotik dan mengurangi toksisitas yang disebabkan oleh antibiotik. Riset menunjukkan bahwa kombinasi oregano dengan ciprofloxacin memiliki sifat sinergis yang dapat menurunkan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada mikroba *S. typhi* [4]. Bersumber dari riset tersebut, maka adanya penambahan bahan alam dapat meningkatkan efek untuk mengatasi infeksi.

Bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai kombinasi dengan antibiotik ialah daun kersen. Ekstrak etanol daun kersen mengandung senyawa kimia berupa komponen golongan tanin, flavonoid, alkaloid,

steroid, serta saponin yang mampu digunakan menjadi agen antimikroba [5,6]. Riset sebelumnya membuktikan bahwasanya ekstrak etanol daun kersen pada konsentrasi 10% menunjukkan daya antibakteri pada *S. typhi* dengan zona hambat sejumlah 13,67 mm [7]. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwasanya ekstrak etanol daun kersen pada konsentrasi 25% menunjukkan daya antibakteri pada *S. typhi* dengan zona hambat sebanyak 13,99 mm [6].

Hasil aktivitas kombinasi antibiotik dapat ditunjukkan menggunakan penetapan skor FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Index*). Nilai FICI dapat menginterpretasikan hasil gabungan ekstrak etanol daun kersen dan kloramfenikol apakah menghasilkan pengaruh kolaboratif, kumulatif, *indifferent*, maupun antagonis [8]. Pada studi ini akan dilakukan uji kombinasi ekstrak etanol daun kersen dan kloramfenikol pada *S. typhi* untuk mengetahui efek yang diberikan pada kombinasi kedua senyawa tersebut dengan metode *checkerboard assay*.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam studi ini ialah almari pengering, gelas, oven (Memmert), timbangan analitik (Ohaus), *rotary evaporator* (Stuart), *waterbath* (Memmert), lampu UV 354 nm dan UV 366 nm, vortex, mikropipet (Socorex®), bunsen, ose, 96-well-plate, neraca analitik, autoklaf (Hirayama), *Laminar Air Flow*, dan incubator (Memmert).

Bahan yang digunakan ialah daun kersen (Kartasura, Jawa Tengah), etanol 96% (Medika), serbuk Mg, HCl, gelatin, FeCl₃ 5%, petroleum eter, asam asetat anhidrat, asam sulfat, reagen Mayer dan Dragendorff, biakan bakteri *S. typhi*, antibiotik kloramfenikol, standar McFarland 0,5 (1,5x10⁸ CFU/mL), media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid), media *Mueller Hinton Broth* (Oxoid), reagen resazurin, pelarut DMSO, NaCl 0,9%, pereaksi sempnot FeCl₃, sitroborat, dragendorff, plat silika gel GF₂₅₄, dan akuades.

Identifikasi Sampel

Sampel yang dimanfaatkan yakni daun kersen yang didapat dari Kartasura dan dideterminasi di Laboratorium Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Pembuatan Ekstrak Daun Kersen

Daun kersen dilakukan proses pencucian dengan air yang kemudian dilakukan proses pengeringan dengan oven bersuhu 40°C dalam kurun waktu 24 jam. Setelah mengering, daun kersen dilakukan sortasi kering dan dihaluskan [5]. Hasil serbuk simplisia lalu dilaksanakan proses ekstraksi dengan teknik maserasi dengan etanol 96%. Serbuk sejumlah 700 gram dilakukan proses perendaman melalui dua tahap dengan total volume 12 L. Tahap pertama digunakan etanol 96% sebanyak 7 L (1:10) b/v dan dibiarkan selama 5 hari pada wadah tertutup serta diaduk setiap hari. Lalu, hasil maserasi ditapis memanfaatkan kertas saring hingga diperoleh filtrat dan residu. Selanjutnya dilakukan tahap kedua yaitu residu diekstraksi ulang menggunakan 5 L etanol 96% pada kurun waktu 2 hari serta ditapis hingga didapatkan filtrat. Kedua filtrat dicampurkan serta dilakukan proses penguapan dengan *rotary evaporator* bersuhu 50°C dan dikentalkan menggunakan *waterbath* [9].

Analisis Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun kersen dicampurkan dengan 1 ml etanol serta ditambahkan 0,1 g bubuk Mg serta 10 ml HCl kental. Temuan dikatakan positif jika diperoleh warna merah ungu maupun merah jingga [9].

b. Uji Saponin

Ekstrak daun kersen sebanyak 500 mg dicairkan pada 10 ml air panas serta dibiarkan hingga suhu ruang. Selanjutnya, digojog dalam kurun waktu 10 detik serta diperoleh busa dengan tinggi 1-10 cm. Ekstrak memiliki kandungan saponin apabila diperoleh busa yang konstan dengan penambahan 1 tetes HCl 1% [9].

c. Uji Tanin

20 mg ekstrak dilarutkan dalam 4 ml etanol. Hasil pelarutan dibagi pada 2 tabung reaksi. Tabung pertama dimasukkan 5 tetes gelatin 10%, hasil dianggap positif jika ada pembentukan residu. Tabung kedua ditambahkan FeCl₃ 5%, hasil dikatakan positif jika berubah warna biru tua maupun hitam kehijauan [10].

d. Uji Steroid

Ekstrak etanol daun kersen dilarutkan dalam eter dan disaring. Hasil pelarutan dimasukkan 2 tetes asam asetat anhidrat serta 1 tetes asam sulfat. Temuan dikatakan positif apabila muncul warna ungu maupun biru [11].

e. Uji Alkaloid

Sebanyak 500 mg ekstrak etanol daun kersen dicampurkan dengan 1 ml HCl 2 N dan 9 ml aquades, lalu diberi perlakuan pemanasan dalam kurun waktu 2 menit dan ditunggu hingga suhu ruang. Campuran ditapis dan dibagi dalam 3 tabung reaksi. Tiap-tiap tabung diberi 2 tetes larutan pereaksi (Mayer dan Dragendorff). Hasil dikatakan optimal apabila muncul presipitat putih dan kuning jingga. Ekstrak dikatakan mempunyai kandungan alkaloid jika memiliki hasil positif minimum 2 dari uji tersebut [9].

Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pengujian KLT digunakan fase diam yaitu plat silika gel GF₂₅₄ yang berukuran 7x1 cm serta fase gerak berupa kloroform : metanol (8:2 v/v) yang telah dijenuhkan. Plat silika gel GF₂₅₄ diaktifkan dulu dengan oven bersuhu 110°C pada kurun waktu 10 menit. Ekstrak dibuat dengan konsentrasi 1% b/v, lalu ditotolkan ekstrak pada plat dan dielusi. Hasil dari elusi teramati pada cahaya tampak, di bawah lampu UV 254 nm, serta lampu UV 366 nm. Tahapan selanjutnya diperlukan pereaksi semprot untuk mempertegas adanya kandungan senyawa aktif dari ekstrak [12].

Sterilisasi Alat

Peralatan gelas dibalut menggunakan kertas kemudian dilakukan proses sterilisasi menggunakan oven pada temperatur 180 °C durasi 2 jam. Media MHA dan MHB disterilisasi dengan autoklaf bersuhu 121°C [12].

Pembuatan Media

Media *Mueller Hinton Broth* (MHB) diambil sebanyak 21 gram serbuk lalu diencerkan pada 1 L aquades serta disterilisasi durasi 15 menit bersuhu 121°C pada autoklaf [13]. Media MHA diambil sejumlah 9,5 gram dan diencerkan pada 250 mL akuades [12].

Pembuatan dan Peremajaan Suspensi Bakteri *S. typhi*

Pembuatan suspensi bakteri *S. typhi* dilaksanakan dengan menanam mikroba pada media BHI dan dimasukkan pada *incubator shaker*. Hasil suspensi diambil 20 µL untuk ditumbuhkan pada media MHA dengan metode *streak plate* untuk peremajaan bakteri. Lalu, diambil 3-5 koloni dan dimasukkan pada tabung reaksi, lalu kekeruhan suspensi disesuaikan hingga mencapai tingkat yang ekuivalen dengan standar McFarland, yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml menggunakan NaCl 0,9%. Hasil suspensi bakteri diencerkan menggunakan MHB dengan perbandingan 1:150 hingga mencapai konsentrasi sebesar 1×10^6 CFU/ml [12,14,15].

Pembuatan Reagen Resazurin

Reagen resazurin sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1 ml akuades (0,1% b/v), apabila sudah homogen disterilkan dengan *syringe filter* 0,22 µm. Reagen disimpan pada suhu 4°C dengan maksimal selama 2 pekan setelah preparasi [16].

Uji Aktivitas Antibakteri

a. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan KHM ekstrak etanol daun kersen serta kloramfenikol terhadap *S. typhi* dilakukan menggunakan metode mikrodilusi dengan 96-well microplate dengan tiga kali replikasi. Konsentrasi awal yang digunakan pada ekstrak etanol daun kersen ialah 100 mg/ml [17]. Ekstrak etanol daun kersen telah diuji terhadap *S. typhi* memiliki nilai KHM sebesar > 250 µg/ml sehingga diperlukan rentang konsentrasi yang lebih tinggi [18]. Metode mikrodilusi digunakan menggunakan metode menurut Balouiri dan Sufian dengan modifikasi. Ekstrak etanol daun kersen dilarutkan dengan DMSO hingga mencapai konsentrasi 100 mg/ml sebagai larutan stok sehingga didapatkan konsentrasi 10 kali dari konsentrasi yang diinginkan. Lalu diencerkan larutan stok dengan perbandingan 1:10 menggunakan media MHB. Sebanyak 100 µl ekstrak dimasukkan pada sumuran pertama dan diberikan 50 µl media MHB pada sumuran kedua hingga keduabelas. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dengan mengambil 50 µl dari sumuran pertama dan dipindahkan pada sumuran kedua hingga sumuran kesepuluh, untuk sisanya dibuang. Sumuran kesebelas digunakan sebagai kontrol pertumbuhan bakteri yang berisi media MHB dan bakteri serta sumuran

kedua belas digunakan sebagai kontrol media MHB. Seluruh sumuran ditambahkan bakteri *S. typhi* yang telah disiapkan sebanyak 50 µl. Volume akhir untuk setiap sumuran sebesar 100 µl. Pada baris D, E, dan F digunakan sebagai kontrol pelarut yaitu DMSO menggunakan metode yang sama pada uji ekstrak [15,19].

Microplate yang sudah diisi kemudian dilakukan inkubasi dengan temperatur 37°C durasi 24 jam. Setelah itu, seluruh sumuran diberikan reagen resazurin (0,1% b/v) sebanyak 20 µl sebagai pewarna untuk penanda bertumbuhnya bakteri. *Microplate* dilakukan inkubasi kembali bersuhu 37°C durasi 1 jam. Adanya perubahan warna dari biru atau ungu menjadi merah muda menunjukkan bahwa sel aktif mengalami metabolisme atau tumbuh. Sedangkan jika muncul warna biru gelap menunjukkan bahwa bakteri tidak tumbuh [19,20]. Lalu, penentuan KHM kloramfenikol digunakan konsentrasi awal sebesar 512 µg/ml. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kloramfenikol memiliki KHM sebesar 12,5 µg/ml [21]. Pengujian dilakukan dengan prosedur yang sama dengan penentuan KHM ekstrak etanol daun kersen pada *microplate* yang berbeda.

b. Uji Kombinasi dengan Metode Checkerboard Assay

Ekstrak etanol daun kersen serta kloramfenikol dilakukan uji kombinasi dengan metode *checkerboard assay*. Pengujian dilakukan dengan menyiapkan dua buah 96-well-*microplate*. *Microplate* pertama digunakan untuk mengencerkan ekstrak dan uji kombinasi, sedangkan *microplate* kedua untuk mengencerkan kloramfenikol. Larutan stok ekstrak dan kloramfenikol dibuat dengan sepuluh kali dari konsentrasi tertinggi.

- Pengujian pada *microplate* pertama

Microplate pertama pada prosedur awal digunakan untuk meletakkan ekstrak dimana KHM ekstrak diposisikan pada sel A7 sehingga diperlukan larutan stok yang sesuai untuk konsentrasi pada sumuran awal. Lalu, sebanyak 50 µl MHB ditambahkan pada setiap sumuran kecuali pada kolom 1 dan 12, namun ditambahkan pada sumur H12. Ekstrak sebanyak 50 µl ditambahkan pada sumur A12 hingga G12 dan sumur A11 hingga H11, lalu dilakukan pengenceran dari kolom 11 hingga kolom 2, kemudian dibuang sebanyak 50 µl dari kolom 2 agar volume setiap sumur setara [22].

- Pengujian pada *microplate* kedua

Microplate kedua digunakan untuk meletakkan kloramfenikol dimana KHM kloramfenikol diposisikan pada sel E1. Sebanyak 100 µl MHB ditambahkan pada setiap sumuran kecuali pada baris A dan H dan diberikan 100 µl kloramfenikol pada sumur H1 hingga H11 dan G1 hingga G12. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga baris B, lalu dibuang sebanyak 100 µl dari baris B agar volume setiap sumur setara hingga volume akhir yang didapatkan pada setiap sumur sebesar 100 µl [22].

- Kombinasi pada *microplate* pertama

Pada *microplate* kedua diambil 50 µl larutan dari sumur B1-B11, lalu dipindahkan pada tempat yang sama di baris B di *microplate* pertama dan dilakukan pengulangan untuk baris selanjutnya hingga selesai. Lalu ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 50 µl kecuali pada sumur H12 sebagai kontrol media, sedangkan pada sumur A1 ditambahkan 50 µl bakteri sebagai kontrol pertumbuhan bakteri. *Microplate* yang berisi kombinasi ekstrak dan kloramfenikol diinkubasi dengan temperatur 37°C durasi 24 jam. Lalu, seluruh sumuran diberikan reagen resazurin (0,1% b/v) sebanyak 20 µl sebagai pewarna dan diinkubasi lagi selama 1 jam [19,20,22], skema *checkerboard assay* dapat dilihat pada gambar 1.

Analisis Data

Hasil dari uji fitokimia dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil pengendapan atau berubahnya warna yang ada setelah ditambahkan reagen [9–11]. Untuk hasil dari *checkerboard assay* dianalisis dengan menentukan nilai FICI. Nilai FICI dihitung untuk menentukan aktivitas kombinasi dari dua agen antibakteri. Berikut rumus penentuan nilai FICI [23].

$$FICI = FIC(A) + FIC(B)$$

$$FICI = \frac{[A]}{KHM(A)} + \frac{[B]}{KHM(B)}$$

Keterangan:

FIC(A) = Fractional Inhibitory Concentration ekstrak etanol daun kersen

FIC(B) = Fractional Inhibitory Concentration kloramfenikol

[A] = Nilai KHM ekstrak etanol daun kersen dalam kombinasi

[B] = Nilai KHM kloramfenikol dalam kombinasi

KHM(A) = Nilai KHM dari ekstrak etanol daun kersen tunggal

KHM(B) = Nilai KHM dari kloramfenikol tunggal

Menurut Brooks, kombinasi dari dua agen antibakteri mampu mendapatkan karakteristik yang ditampilkan dalam Tabel 1 [23].

Tabel 1. Karakteristik nilai FICI

Nilai FICI	Karakteristik
$\leq 0,5$	Sinergis
$0,5 < x \leq 1$	Aditif
$1 < x \leq 4$	<i>Indifferent</i>
> 4	Antagonis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1/32 KHM	1/16 KHM	1/8 KHM	1/4 KHM	1/2 KHM	KHM	2 x KHM	4 x KHM	8 x KHM	16 x KHM	32 x KHM
B	1/8 KHM											
C	1/4 KHM											
D	1/2 KHM											
E	KHM											
F	2 x KHM											
G	4 x KHM											
H	8 x KHM											

Keterangan:

	: Kontrol media (media MHB)
	: Kontrol pertumbuhan bakteri (media MHB + bakteri <i>S.typhi</i>)
	: Uji kombinasi
	: Uji tunggal ekstrak etanol daun kersen
	: Uji tunggal kloramfenikol

Gambar 1. Desain checkerboard assay

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi Sampel

Daun kersen diidentifikasi dengan proses determinasi di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta dengan No: 025/A.E-I/LAB.BIO/IX/2025. Hasil determinasi mengindikasikan bahwasanya daun kersen yang dimanfaatkan terbukti daun kersen yang masuk dalam famili Muntingiaceae. Hasil determinasi mendeskripsikan bahwa daun kersen memiliki karakteristik daun tunggal berwarna hijau, duduk daun berseling, pinggir daun bergerigi, dan permukaan daun memiliki bulu.

Ekstraksi Daun Kersen

Daun kersen diekstraksi memanfaatkan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96%. Teknik maserasi digunakan pada studi ini dikarenakan maserasi memiliki protokol yang sederhana dan dapat mempertahankan stabilitas bahan alam yang bersifat termolabil. Pemilihan etanol sebagai pelarut didasarkan dikarenakan karakteristiknya yang bersifat umum, mudah diakses, dapat menarik senyawa dari berbagai sifat, serta memiliki nilai toksisitas yang rendah [9,24]. Ekstraksi dilakukan dengan berat sampel sebanyak 704,56 gram yang menghasilkan ekstrak sebanyak 133,45 gram dengan rendemen sebesar 18,94% b/b. Ekstrak yang dihasilkan berbentuk ekstrak pekat, memiliki warna hijau kecoklatan dengan aroma khas daun kersen.

Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia bermaksud guna mengidentifikasi klasifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak secara kualitatif. Pengujian dilakukan dengan menambahkan pereaksi sehingga dapat dilihat perubahan

warna atau terjadinya pembentukan endapan. Hasil analisis fitokimia ditunjukkan pada Tabel 2 yang mengindikasikan bahwasanya ekstrak daun kersen mempunyai kandungan golongan senyawa alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, serta saponin yang sesuai dengan penelitian sebelumnya [9].

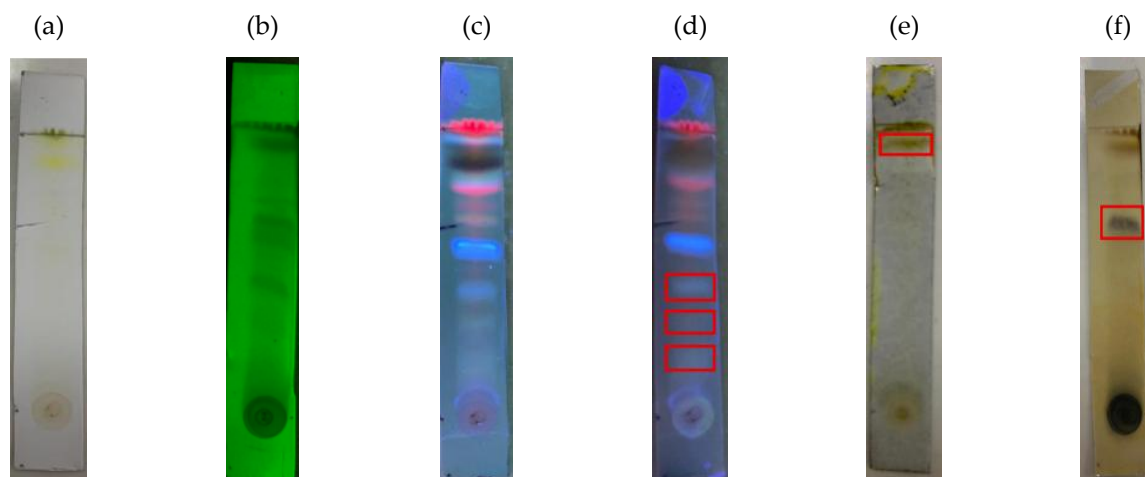
Tabel 2. Hasil analisis fitokimia

No	Golongan Senyawa	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1.	Alkaloid	Mayer	Endapan putih	+
		Dragendorff	Coklat kehitaman	-
		Bouchardat	Coklat kehitaman	+
2.	Steroid	Asam asetat anhidrat + asam sulfat	Hijau biru	+
3.	Flavonoid	Serbuk Mg + HCl pekat	Merah jingga	+
4.	Tanin	Gelatin 1%	Endapan	+
5.	Saponin	HCl	Terbentuk busa	+

Uji KLT

Uji KLT dilakukan bertujuan untuk menegaskan kembali dari hasil analisis fitokimia sehingga dapat memperkuat bahwa adanya kandungan senyawa aktif pada ekstrak. Uji KLT dilakukan menggunakan pelarut kloroform : metanol (8:2 v/v). Hasil uji kemudian direaksikan dengan reagen semprot yang sesuai.

Hasil uji KLT ditunjukkan pada Gambar 2. Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menyemprot reagen sitroborat yang menimbulkan noda warna kuning-kehijauan yang diamati dengan lampu UV 366 nm [12]. Temuan ini mengindikasikan bahwasanya ekstrak memiliki kandungan golongan senyawa flavonoid dengan skor Rf sejumlah 0,2; 0,34; serta 0,46. Senyawa alkaloid dapat diidentifikasi dengan menyemprot reagen dragendorff yang memberikan hasil bercak berwarna coklat atau jingga pada sinar tampak [12]. Dari uji memberikan hasil bahwa ekstrak mengandung golongan senyawa alkaloid dengan nilai Rf sebesar 0,94. Tanin dapat dideteksi dengan penyemprotan reagen FeCl₃ yang memberikan warna ungu kehitaman pada bercak di sinar tampak [12]. Hasil deteksi tanin memberikan warna ungu kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,66.



Gambar 1. Hasil uji KLT pada fase diam silika gel GF₂₅₄ serta fase gerak yaitu kloroform : metanol (8:2 v/v). (a) Sinar tampak, (b) UV 254 nm, (c) Sinar UV 366 nm, (d) Sitroborat-UV 366 nm (Rf= 0,2; 0,34; 0,46), (e) Dragendorff-sinar tampak (Rf= 0,94), (f) FeCl₃-sinar tampak (Rf= 0,66)

Hasil uji fitokimia dengan metode KLT yang didapatkan selaras dengan studi terdahulu yang mengindikasikan bahwasanya ekstrak daun kersen memiliki golongan zat flavonoid, alkaloid, dan tanin [12]. Temuan pengujian KLT dapat menunjukkan bahwasanya ekstrak terbukti memiliki kandungan golongan senyawa aktif yang selaras dengan hasil uji fitokimia yang dilakukan sebelumnya.

Hasil Uji Aktivitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Kersen dan Kloramfenikol terhadap *S. typhi*

Temuan pengujian aktivitas antibakteri ditunjukkan dalam Tabel 3 dan uji *checkerboard assay* dijabarkan dalam Gambar 3.

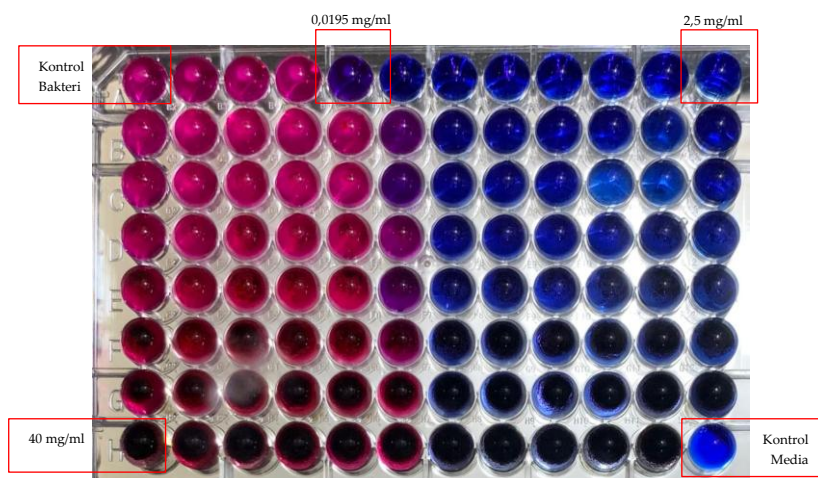
Tabel 3. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kersen dan kloramfenikol

Bakteri	Agen antibakteri	KHM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. typhi</i>	Ekstrak etanol daun kersen	> 1000
	Kloramfenikol	19,5

Metode *checkerboard assay* merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengevaluasi interaksi kombinasi antara dua agen antibakteri menggunakan *96-well-microplate*. Metode ini dilakukan dengan sistem mikrodilusi dengan pengenceran seri ganda dimana dua agen antibakteri diuji baik secara tunggal dengan menentukan KHM masing-masing agen serta diuji secara kombinasi. Interaksi kombinasi yang dihasilkan meliputi Interaksi yang dihasilkan dari kombinasi dapat berupa efek sinergisme, aditif, *indifferent*, dan antagonis [25].

Sinergisme menghasilkan efek yang lebih poten ketika digunakan secara bersama. Aditif memberi dampak kombinasi yang setara dengan total dampak pada tiap-tiap agen antibakteri. *Indifferent* berarti tidak ada efek kombinasi yang diberikan sehingga tidak terjadi kenaikan atau penurunan efek. Sedangkan antagonis memberikan penurunan efek ketika kedua agen dikombinasikan [26]. Untuk melihat hasil uji digunakan resazurin sebagai indikator warna yang memiliki mekanisme kerja yaitu menilai aktivitas metabolik sel bakteri setelah inkubasi dalam uji KHM.

Ketika bakteri masih hidup, enzim yang aktif akan mentransfer elektron ke resazurin sehingga resazurin yang berbentuk teroksidasi akan direduksi menjadi resorufin. Bentuk resorufin ini bersifat lebih berwarna (pink) dan sangat fluoresen, berbeda dengan resazurin yang pada awalnya berwarna biru-ungu dan kurang fluoresen. Uji ini memanfaatkan perubahan warna ini sebagai tanda bahwa adanya pertumbuhan bakteri di dalam sumur. Ketika resazurin tetap berada dalam bentuk biru (tidak berubah warna) diartikan bahwa tidak terjadi reduksi oleh sel sehingga mengindikasikan bahwasanya pada kadar tersebut tidak terjadi peningkatan mikroorganisme [16].

**Gambar 2.** Checkerboard assay uji kombinasi ekstrak etanol daun kersen (baris) dan kloramfenikol (kolom)

Aktivitas antibakteri suatu ekstrak mampu dinyatakan baik jika mempunyai skor KHM < 100 $\mu\text{g/ml}$, kategori sedang jika skor KHM berada pada rentang 101 – 500 $\mu\text{g/ml}$, kategori lemah apabila nilai KHM berada pada rentang 501 – 1000 $\mu\text{g/ml}$, serta tidak aktif apabila memiliki skor KHM > 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dan memiliki hasil yang sama.

Hasil uji dari kloramfenikol menunjukkan bahwa kloramfenikol dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang memiliki KHM sebesar 19,5 $\mu\text{g/ml}$ yang ditunjukkan pada sumuran A5 pada Gambar 2. Studi melaporkan bahwa nilai KHM kloramfenikol pada penelitian sebelumnya memiliki nilai sebesar 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Menurut standar CLSI, nilai KHM kloramfenikol $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ dikategorikan sensitif, 16 $\mu\text{g/mL}$ intermediet, dan $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ resisten. Dengan demikian, nilai KHM sebesar 19,5 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa bakteri uji berada di antara kategori intermediet-resisten terhadap kloramfenikol [21,27].

Nilai KHM yang dihasilkan dapat berbeda karena beberapa faktor yaitu dari inokulum bakteri yang berbeda, adanya perbedaan strain bakteri, serta densitas bakteri yang dapat mengubah titik hambat minimum yang diukur [28]. Kloramfenikol dapat menghambat pertumbuhan bakteri dikarenakan kloramfenikol memiliki mekanisme kerja yaitu menghambat ikatan asam amino pada unit 50S ribosom dengan menghalangi peptidiltransferase dengan sifat bakteristatik [29]. Untuk hasil ekstrak mengindikasikan bahwasanya ekstrak

etanol daun kersen belum mampu menekan pertumbuhan mikroba *S. typhi*. Riset sebelumnya menunjukkan bahwasanya ekstrak daun kersen mempunyai skor KHM sebanyak > 250 µg/ml yang berada pada tingkat menengah [18].

Hasil ekstrak tidak dapat menghambat bakteri dikarenakan bahwa bakteri *S. typhi* ialah mikroorganisme gram negatif yang memiliki struktur unik yaitu memiliki permukaan yang bersifat hidrofob sehingga dapat menghambat masuknya senyawa aktif menuju target di dalam sel. Bakteri gram negatif memiliki dua lapisan membran sehingga sebagian besar ekstrak sangat sulit untuk menembus struktur membran tersebut sehingga tidak memiliki aktivitas dalam menghambat bakteri [30]. Selain itu, ekstrak tanaman memiliki kandungan senyawa aktif yang cukup kompleks sehingga dapat mempengaruhi hasil pengujian [31]. Dari hasil uji kombinasi dari *checkerboard assay* menunjukkan bahwa nilai FICI tidak dapat ditentukan karena tidak adanya nilai KHM dari ekstrak etanol daun kersen.

Hasil KHM uji kombinasi memperlihatkan bahwa adanya kenaikan KHM yang ditunjukkan pada sumuran B6 yang seharusnya pada KHM tunggal kloramfenikol bisa menghambat bakteri dengan konsentrasi dengan nilai yang lebih rendah. Adanya perbedaan hasil dari riset antara uji kombinasi ekstrak oregano dan ciprofloxacin dengan uji ini dipengaruhi oleh sifat senyawa aktif dalam ekstrak dan mekanisme interaksinya dengan antibiotik. Ekstrak oregano mengandung senyawa aktif utama yaitu carvacrol yang memiliki mekanisme kerja dalam merusak membran sel bakteri, sehingga mampu meningkatkan penetrasi antibiotik dan menghasilkan efek sinergis terhadap *S. typhi*. Sebaliknya, ekstrak daun kersen yang digunakan masih berbentuk ekstrak kasar yang mengandung berbagai senyawa bioaktif dengan mekanisme kerja yang beragam, sehingga berpotensi terjadi interaksi antar senyawa yang saling meniadakan efek antibakteri [4].

Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa interaksi ekstrak dan antibiotik tidak selalu bersifat sinergis. Beberapa ekstrak tanaman, khususnya yang kaya akan polifenol, dapat meningkatkan nilai KHM antibiotik terhadap bakteri gram negatif, contohnya yaitu ekstrak tertentu menaikkan KHM ciprofloxacin terhadap *Escherichia coli* hingga empat kali lipat dibandingkan antibiotik sendiri. Temuan ini mengindikasikan bahwa senyawa tanaman dapat melindungi bakteri dari aksi antibiotik sehingga diperlukan konsentrasi antibiotik yang lebih tinggi untuk mencapai hambatan pertumbuhan [31,32]. Riset lanjutan disarankan untuk dilakukan fraksinasi ekstrak daun kersen untuk mengisolasi senyawa aktif yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri sehingga dapat memiliki hasil yang lebih spesifik.

Kesimpulan

Ekstrak etanol daun kersen mengandung kelompok zat alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, serta saponin. Hasil penentuan KHM tunggal untuk kloramfenikol memiliki nilai sebesar 19,5 µg/ml dan ekstrak > 1000 µg/ml. Hasil uji kombinasi menunjukkan adanya kenaikan KHM pada kloramfenikol, namun interaksi tidak dapat diklasifikasikan secara pasti.

Konflik Kepentingan

Studi dilaksanakan secara independen serta netral dengan menjamin bahwasanya keseluruhan tahapan dan hasil studi murni berasal dari proses akademik tanpa adanya pengaruh kepentingan pihak manapun.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya pada Universitas Muhammadiyah Surakarta atas berjalannya studi ini yang dapat terlaksana dengan baik berkat dukungan oleh banyak pihak.

Referensi

- [1] Imara F. Salmonella typhi Bakteri Penyebab Demam Tifoid. In: Prosiding Seminar Nasional Biologi di Era Pandemi COVID-19 [Internet]. 2020. p. 1–5. Available from: <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/psb/>
- [2] Khairunnisa S, Hidayat EM, Herardi R. Hubungan Jumlah Leukosit dan Persentase Limfosit terhadap Tingkat Demam pada Pasien Anak dengan Demam Tifoid di RSUD Budhi Asih Tahun 2018 – Oktober

2019. In: Seminar Nasional Riset Kedokteran (SENSORIK) [Internet]. 2020. p. 60–9. Available from: <https://conference.upnvj.ac.id/index.php/sensorik/article/download/434/196>
- [3] Sanjaya DA, Meriyani H, Juanita RA, Siada NB. Kajian Literatur: Profil Resistensi Salmonella typhi dan Pemilihan Antibiotik Pada Demam Tifoid. JPSCR J Pharm Sci Clin Res. 2022;7(2):107–21.
- [4] Bharti V, Vasudeva N, Sharma S, Duhan J. Antibacterial activities of Origanum vulgare alone and in combination with different antimicrobials against clinical isolates of Salmonella typhi. Anc Sci Life. 2013;32(4):212.
- [5] Annisa N, Najib SZ. Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Total Fenol Flavonoid Dan Tanin Pada Daun Kersen (Muntingia calabura L.). Indones J Pharm Herb Med. 2022;1(2):96–104.
- [6] Juariah S, Yolandan N, Surya A. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Kersen terhadap Staphylococcus Aureus dan Salmonella Typhi. J Endur Kaji Ilm Probl Kesehat [Internet]. 2020;5(2):338–44. Available from: <http://doi.org/10.22216/jen.v5i2.3140>
- [7] Trisharyanti I, Febriani R. Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Terhadap Salmonella Typhi Resisten Kloramfenikol. JPSCR J Pharm Sci Clin Res. 2017;2:66–7.
- [8] A'iana L, Sari R, Apridamayanti P. Penentuan Nilai FICI Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Daun Lidah Buaya (Aloe vera (L) Burm. f) dan Gentamisin Sulfat terhadap Bakteri Escherichia coli. Pharm Sci Res. 2017;4(3):132–42.
- [9] Vonna A, Desiyana LS, Hafsyari R, Illian DN. Analisis Fitokimia dan Karakterisasi dari Ekstrak Etanol Daun Kersen (Muntingia calabura L.). Bioleuser [Internet]. 2021;5(1):8–12. Available from: <http://www.jurnal.unsyiah.ac.id/bioleuser>
- [10] Ananta MNF, Nuralyza I, Solehah K, Pratama IS, Aini SR. Skrining fitokimia ekstrak air dan ekstrak etanol 70% Propolis Trigona sp. asal Lombok Utara. Sasambo J Pharm. 2024;5(1):38–45.
- [11] Pamungkas JD, Anam K, Kusri D. Penentuan Total Kadar Fenol dari Daun Kersen Segar, Kering dan Rontok (Muntingia calabura L.) serta Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH. J Kim Sains dan Apl. 2016;19(1):15–20.
- [12] Adriana Putri Hidayah A, Haqqi Hidayatullah M. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kersen (Muntingia calabura L.) Terhadap Bacillus cereus Dan Shigella sonnei Serta Bioautografinya Antibacterial Activity Of Kersen Leaf Etanolic Extract (Muntingia calabura L.) AGAINST Bacillus cereus DAN Shig. Usadha J Pharm [Internet]. 2025;4(3):312–25. Available from: <https://jsr.lib.ums.ac.id/index.php/ujp>
- [13] Permana A, Mazlan N. Uji Daya Hambat Antibakteri Kombinasi Ekstrak Kulit Buah Manggis Komersial (Garcinia mangostana L) dan Amoksisilin Terhadap Bakteri Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Menurut Centers for Disease Control and Prevention , setiap tahun di. Anakes J Ilm Anal Kesehat. 2024;10(1):109–25.
- [14] Zahra AN, Maryati. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (Piper betle L .) Terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis Dan Escherichia coli Serta Uji Bioautografinya Antibacterial Activity Test Of Ethanol Extract Of Green Betel Leaf (Piper betle L .) A. Usadha J Pharm. 2024;3(3):327–41.
- [15] Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal [Internet]. 2016;6(2):71–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- [16] Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol Lett. 2016;38(6):1015–9.
- [17] Zakaria ZA, Sufian AS, Ramasamy K, Ahmat N, Sulaiman MR, Arifah AK, et al. In vitro antimicrobial activity of Muntingia calabura extracts and fractions. African J Microbiol Res. 2010;4(4):304–8.
- [18] Chang CC, Sim KM, Lim TM. Phytochemical Study of the Leaves of Muntingia calabura and their Antibacterial Activity. Malaysian J Chem. 2023;25(4):155–64.
- [19] Sufian AS, Ramasamy K, Ahmat N, Zakaria ZA, Yusof MIM. Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of Muntingia calabura L. J Ethnopharmacol [Internet]. 2013;146(1):198–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.032>
- [20] Khalil MA, El-Shanshoury AERR, Alghamdi MA, Sun J, Ali SS. Streptomyces catenulae as a Novel Marine Actinobacterium Mediated Silver Nanoparticles: Characterization, Biological Activities, and Proposed Mechanism of Antibacterial Action. Front Microbiol. 2022;13(833154):1–17.
- [21] Rudiansyah D, Dermawan A, Mulia YS. Analisis Potensi Antibiotika Berdasarkan Konsentrasi Hambat Minimal Dan Konsentrasi Bakterisidal Minimal Kloramfenikol Dan Amoksisilin Terhadap Salmonella

- Typhi. J Ris Kesehat Poltekkes Depkes Bandung. 2021;13(1):50–6.
- [22] Verma P. Methods for Determining Bactericidal Activity and Antimicrobial Interactions: Synergy Testing, Time-Kill Curves, and Population Analysis. In: Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. 2007. p. 275–98.
- [23] Apridamayanti P, Robiyanto R, Farica T. FICI Value Determination of Combination of *Aquilaria microcarpa* Baill. Ethanolic Extract with Amoxicillin against *Salmonella typhi*. Kartika J Ilm Farm. 2021;8(1):9–15.
- [24] Makalunsenge MO, Yudistira A, Rumondor EM. Antioxidant Activity Test of Extracts and Fractions Of *Callyspongia aerizusa* Obtained From Manado Tua Island Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Dan Fraksi Dari *Callyspongia aerizusa*. J Pharmacon [Internet]. 2022;11(November):1679–84. Available from: <http://www.ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jpbhp>
- [25] Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. MethodsX [Internet]. 2021;8(October):101543. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543>
- [26] Sakinah N, Rialita T, Subroto E, Pangan JT, Teknologi F, Pertanian I, et al. Kajian Interaksi Berbagai Kombinasi Minyak Atsiri Terhadap Mikroorganisme Perusak Pangan : Studi Kepustakaan. J Sains dan Teknol Pangan. 2021;6(4):4180–91.
- [27] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. 1–332 p.
- [28] Bhalodi AA, Oppermann N, Campeau SA, Humphries RM. Variability of beta-lactam broth microdilution for *pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(10):1–11.
- [29] Erviani AE. Analisis Multidrug Resistensi Terhadap Antibiotik Pada *Salmonella typhi* Dengan Teknik Multiplex PCR. Biog J Ilm Biol. 2013;1(1):51–60.
- [30] Azhari M, Sengaji RF. Antimicrobial Activity of Turmeric, Ginger, and Galangal Rhizome Ethanol Extracts in Combination Using the Checkerboard Method. J Borneo. 2023;3(3):139–48.
- [31] Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsakris Z, Rozos G, Tsigalou C, et al. Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. Antibiotics. 2022;11(8):1–23.
- [32] El-Sakhawy MAM. Combinational Effect of Selected Medicinal Plants and Antibiotics Against Pathogenic Bacteria. Pakistan J Biol Sci. 2023;26(3):108–18.