



Efektivitas SNEDDS Kombinasi Fraksi Etil Asetat Daun Cengkodok (*Melasthoma malabathricum*)-Antibiotik terhadap Bakteri Hasil Isolat dari Pasien Ulkus Diabetik

Rafika Sari^{1*}, Pratiwi Apridamayanti¹, Liza Pratiwi¹

¹ Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:

Penerimaan naskah: 04 Januari 2022
Penerimaan naskah revisi: 30 Maret 2022
Disetujui untuk dipublikasikan: 27 Mei 2022

Kata kunci :

SNEDDS, fraksi daun cengkodok, antibiotik, dan ulkus diabetik

ABSTRAK

Ulkus diabetik adalah keadaan dimana terdapat kelainan neurologis dan penyakit pembuluh darah arteri perifer yang menyebabkan infeksi, ulserasi, dan/atau kerusakan jaringan kulit terdalam pada kaki penderita diabetes melitus (DM). Durasi penyembuhan luka yang tergolong lama adalah dikarenakan penggunaan antibiotik yang salah dengan jangka waktu yang lama, dan bakteri cenderung menjadi resisten terhadap antibiotik. Senyawa fraksi cengkodok yang bersifat antimikroba dikombinasikan antibiotik gentamisin dan siprofloksasin untuk pencegahan dan pengurangan resistensi antibiotik pada penyebab ulkus diabetik. Sediaan obat dalam bentuk *self nanoemulsifying drug delivery system* (SNEDDS) yang merupakan kombinasi optimum antara fraksi daun cengkodok dengan antibiotik gentamisin dan siprofloksasin. Penggunaan SNEDDS pada penelitian ini adalah karena SNEDDS yang dibuat dari formulasi nanoemulsi memiliki ukuran partikel yang kecil, daya serap permukaan yang besar, dan daya dispersi yang baik, sehingga dapat terdispersi secara merata di kulit dan menembus lapisan kulit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas formulasi fraksi daun cengkodok dengan antibiotik gentamisin dan siprofloksasin terhadap *B. cereus* dan *S. aureus* menggunakan sistem penghantaran obat SNEDDS. Pengujian menggunakan metode spotless difusi tanpa menggunakan kertas cakram. Hasil penelitian menunjukkan pengkombinasian fraksi daun cengkodok dengan antibiotik gentamisin dan siprofloksasin memiliki aktivitas lebih baik terhadap bakteri *B. cereus* dan *S. aureus* dibanding fraksi daun cengkodok, gentamisin dan siprofloksasin tunggal.

Kata Kunci: SNEDDS, fraksi daun cengkodok, antibiotik, dan ulkus diabetik

Keywords:

SNEDDS, fraction of cengkodok leaves, antibiotic, and diabetic ulcer

ABSTRACT

Diabetic ulcer is a condition where there are neurological abnormalities and peripheral arterial vascular disease that causes infection, ulceration, and/or damage to the deepest skin tissue on the feet of people with diabetes mellitus (DM). The long duration of wound healing is due to the wrong use of antibiotics for a long time, and bacteria tend to become resistant to antibiotics. Antimicrobial compound fraction of cengkodok combined with gentamicin and ciprofloxacin antibiotics for prevention and reduction of antibiotic resistance in the cause of diabetic ulcers. The drug preparation is in the form of self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS), which is the optimum combination of cengkodok leaf fraction with gentamicin and ciprofloxacin antibiotics. The use of SNEDDS in this study is because the SNEDDS made from nanoemulsion formulations has small particle size, large surface absorption, and good dispersion, so that it can be evenly dispersed on the skin and penetrates the skin layer. This study aims to determine the effectiveness of the formulation cengkodok leaf fraction with gentamicin and ciprofloxacin antibiotics against *B. cereus* and *S. aureus* using the SNEDDS drug delivery system. The test uses the spotless diffusion method without using paper discs. The results showed that the combination of cengkodok leaf fraction with gentamicin and ciprofloxacin antibiotics had better activity against *B. cereus* and *S. aureus* than cengkodok leaf fraction, gentamicin and ciprofloxacin only.

Keywords: SNEDDS, fraction of cengkodok leaves, antibiotic, and diabetic ulcer

PENDAHULUAN

Ulkus Kaki Diabetik (UKD) merupakan komplikasi dari diabetes mellitus dengan ciri luka terbuka pada permukaan kulit atau selaput lendir serta kematian jaringan yang luas disertai dengan adanya invasi bakteri. Berdasarkan data yang diperoleh oleh Abidin (2012) di Klinik Spesialis Perawatan Luka Kitamura diantara 800 pasien diabetes, 470 pasien diantaranya menderita komplikasi UKD (1). Berdasarkan penelitian Tahun 2016 bahwa prevalensi UKD sebesar 14,3 % berakhir dengan kematian 1 tahun pasca amputasi dan 37 % akan meninggal 3 tahun pasca amputasi (2).

Lamanya penyembuhan luka disebabkan penggunaan yang salah dan penggunaan antibiotik dalam jangka panjang, serta organisme yang resisten terhadap suatu antibiotik cenderung menjadi resisten terhadap antibiotik (3). Penggunaan antibiotik secara berlebihan juga mendorong munculnya resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik telah terbukti berakibat pada pengobatan yang tidak efektif dan efisien. Resistensi antibiotik juga berhubungan dengan morbiditas, mortalitas, lama rawat, dan biaya perawatan (4). Kombinasi antara antibiotik yang efektif terbukti mampu membatasi perkembangan dan penyebaran bakteri yang resisten terhadap antibiotik (5). Tujuan khusus penelitian ini adalah menemukan sediaan obat yang efektif dan aplikatif dari fraksi daun cengkodok (FDC) dikombinasikan dengan antibiotik sebagai terapi ulkus diabetik untuk mencegah komplikasi lanjutan dan resiko kecacatan pada pasien DM. Adapun antibiotik topikal yang terbukti resisten yaitu gentamisin dan siprofloksasin. Pada penelitian yang telah dilakukan, fraksi daun cengkodok telah terbukti efektif untuk mengobati luka. Penyembuhan luka bakar dengan formulasi menggunakan salep ekstrak etanol daun cengkodok, efektif pada konsentrasi 5% (6). Ekstrak daun cengkodok, yang diberikan pada tikus yang mengalami perlukaan tidak ditemukan adanya infeksi (7). Formulasi fraksi *malabathricum* dengan antibiotik pada terapi diabetes dengan ulcer di kaki menunjukkan penghambatan komplikasi lanjutan dan resiko lainnya pada penderita diabetes. Kombinasi bahan herbal dan antibiotik menunjukkan efek sinergisme untuk menghindari resistensi antibiotik (8).

Kandungan senyawa aktif pada ekstrak daun cengkodok yang berpotensi sebagai antibakteri yaitu senyawa flavonoid, fenol dan terpenoid. Asam galat merupakan senyawa polifenol yang memiliki sifat semi polar, sehingga dengan menggunakan pelarut etil asetat diharapkan mampu menarik senyawa asam galat. Menurut penelitian Ohemeng dkk dalam Chusnie & Lamb (2011), bahwa senyawa kuarsetin memiliki mekanisme antibakteri

melalui penghambatan pada DNA gyrase pada proses sintesis protein bakteri (9). Mekanisme antibakteri dari senyawa fenol yaitu melalui perusakan dinding sel akibat terbentuknya ikatan hidrogen antara fenol dan protein (10). Aksi terpenoid sebagai antibakteri melalui interaksi senyawa terpenoid dengan porin (protein transmembran) pada bakteri, akibat porin yang rusak menyebabkan sel bakteri kekurangan nutrisi (11). Metabolit yang terkandung pada tanaman tersebut memerlukan suatu sistem penghantaran obat yang dapat meningkatkan penetrasi obat ke dalam kulit dengan ukuran kecil dan meningkatkan kenyamanan dalam pemakaian. *SNEDDS* dapat menjadi solusi dalam permasalahan ini. *SNEDDS* dari sediaan nanoemulsi memiliki permukaan yang luas untuk absorpsi dan daya sebar yang baik dikarenakan ukuran partikel yang kecil sehingga memungkinkan penyebaran yang merata dikulit dan kemampuan untuk terpenetrasi ke dalam lapisan kulit (12). Nanoemulsi dibuat dengan penghantaran obat *self nanoemulsifying drug delivery system* (*SNEDDS*) melalui proses pembuatan yang ekonomis sehingga memungkinkan produksi di industri, serta stabil secara termodinamika (13). *SNEDDS* dibuat dengan menggunakan formula optimum yaitu menggunakan metode *simplex lattice design* dengan *software design expert* versi 7.0.0.

METODE

Preparasi *SNEDDS* kombinasi fraksi etil asetat daun cengkodok *Melastoma malabathricum* L. dengan Ciprofloxacine

SNEDDS dibuat dengan kombinasi Tween 20, propilen glikol dan VCO dengan perbandingan komposisi masing-masing 3,00:2,46:1,54 bagian. Kemudian fraksi etil asetat daun cengkodok dan ciprofloxacine ditambahkan yaitu masing-masing sejumlah 75 mg/ 5 mL *SNEDDS*. Campuran dikondisikan dalam penangas air pada suhu 40°C selama 10 menit. Proses homogenisasi fraksi dalam *carrier* dimaksimalkan dengan vortex 1000 rpm selama 15 menit (14).

Preparasi *SNEDDS* kombinasi fraksi etil asetat daun cengkodok *Melastoma malabathricum* L. dengan Gentamisin

SNEDDS dibuat dengan kombinasi Tween 80: Propilenglikol: *Soybean oil* dengan komposisi 2,69:2,64:1,67 bagian. Kemudian fraksi etil asetat daun cengkodok dan gentamicin ditambahkan yaitu masing-masing sejumlah 50 mg/ 5 mL *SNEDDS*. Campuran dikondisikan dalam penangas air pada suhu 40°C selama 10 menit. Proses homogenisasi fraksi dalam *carrier* dimaksimalkan dengan vortex 1000 rpm selama 15 menit (14). Sejumlah 1 ml *SNEDDS* dicampurkan dengan

aquadest 5 mL dan dihomogenisasi selama 1 menit. Campuran ini dimasukkan kedalam botol spray (14).

MIC fraksi *Melastoma malabathricum*

Konsentrasi fraksi daun *Melastoma malabathricum* yang digunakan adalah 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; dan 0,39 mg/mL (8).

Pembuatan Kurva Baku FDC

Sebanyak 0,125 gram asam galat, kemudian dalam labu ukur 25 mL, dilakukan penambahan 2,5 mL etanol 96 % dan aquadest sampai tanda batas. Panjang gelombang dengan spektrofotometer UV-Vis digunakan 760 nm (15). Kurva baku FDC dibuat sebagai hasil regresi linier konsentrasi versus absorbansi.

Pembuatan Kurva Baku Gentamisin dan siprofloksasin

Sebanyak 25 mg gentamisin dalam 25 mL aquadest. Ukur panjang gelombang maksimum pada panjang gelombang 200-400 nm (16,17).

Pengukuran Solubilitas Kombinasi FDC dan antibiotik dalam Pembawa

Sebanyak 10 mg FDC dan antibiotik ditambahkan kedalam 10 mL pembawa secara terpisah. Campuran ini dikondisikan dalam *waterbath* pada suhu 40°C selama 10 menit.

Optimasi formula komposisi surfaktan, ko-surfaktan dan minyak dengan *Simplex Lattice Design* FDC dengan antibiotik

Optimasi formula SNEDDS dilakukan menggunakan metode *Simplex Lattice Design* dengan *software Design Expert* @versi 7.0.0. Karakteristik sifat fisik yang digunakan yaitu uji transmittan dan pH.

Pengukuran *Emulsification Time*

Media 500 mL dikondisikan di atas *magnetic stirrer* dengan kecepatan 120 rpm (18).

Pengamatan ukuran dan zeta potensial

Pengukuran menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) mengetahui ukuran dan distribusi nanopartikel. Pengukuran potensial zeta dilakukan dengan alat *Zetasizer* (19).

Pengamatan Stabilitas

Siklus freezing sejumlah 6 siklus dan *thawing* menggunakan temperatur antara -21°C dan 25°C dengan lama penyimpanan 48 jam. Setelah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit, dilakukan pengamatan parameter ketidakstabilan (20).

Efektivitas SNEDDS Kombinasi FDC dengan antibiotik secara *in vitro* dan *in vivo*

Pengujian melalui aplikasi penggunaan sediaan pada luka UKD diamati melalui TEM dan pengamatan Biofilm.

Analisis Hasil

Analisis data menggunakan *One way ANOVA* 17.0 dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

HASIL DAN DISKUSI

Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan menggunakan alat autoklaf yang diatur pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inch*) selama 15 menit. Sterilisasi ini dilakukan untuk preparasi alat-alat dan bahan sebagai uji aktivitas antibakteri. Sterilisasi menggunakan autoklaf prinsipnya sama dengan *pressure cooker* (21). Autoklaf memiliki fungsi sebagai alat pensteril dengan banyak kelebihan antara lain pemanasan berlangsung cepat, mempunyai daya tembus, dan menghasilkan kelembaban yang tinggi. Semua proses tersebut akan mempermudah koagulasi protein sel-sel mikroorganisme sehingga kematian mikroorganisme disebabkan oleh suhu bukan karena uap atau tekanannya. Prinsip kerja autoklaf yaitu terjadinya koagulasi yang lebih cepat dalam keadaan basah dibandingkan keadaan kering. Proses sterilisasi dengan autoklaf dapat membunuh mikroba dengan mengkoagulasi atau mendenaturasi protein yang terdapat pada enzim dan membran sel mikroba. Endospora bakteri juga dapat dibunuh dengan proses ini.

Tujuan dilakukan peremajaan bakteri adalah untuk mendapatkan isolat bakteri yang aktif sehingga pertumbuhan bakteri tersebut dapat dioptimalkan. Bakteri tersebut sebelumnya disimpan di lemari pendingin pada keadaan inaktif pada media NA. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk mendapatkan jumlah bakteri yang diinginkan. Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan mengambil bakteri uji dari media peremajaan dengan jarum ose yang akan dipindahkan ke dalam larutan NaCl steril 0,9%. Larutan NaCl steril 0,9% digunakan karena bersifat isotonis dengan cairan sel bakteri sehingga dapat mempertahankan bakteri untuk tetap hidup sebelum dipindahkan ke media pembenihan yang baru. Kekeruhan bakteri uji yang digunakan disetarakan dengan pembanding kekeruhan Mc Farland no. 0,5 yaitu setara dengan jumlah 1×10^8 bakteri/ML (22). Siklus pertumbuhan merupakan pertumbuhan teratur atau berkesinambungan semua komponen suatu organisme. Fase tersebut dapat dibagi menjadi 4 yakni fase pertama disebut fase adaptasi atau lag, yaitu fase penyesuaian bakteri pada suatu lingkungan baru. Ciri dari fase ini yaitu tidak terdapat peningkatan jumlah sel. Fase kedua yakni fase eksponensial atau log merupakan fase dimana terjadinya pembelahan sel, sehingga sel baru terus terbentuk dengan laju yang konstan dan pertumbuhan secara eksponensial. Fase ketiga adalah fase stationer yaitu fase dimana terjadi keseimbangan antara sel yang membelah dengan sel yang mati. Fase terakhir yaitu fase kematian yang merupakan fase dimana jumlah sel yang mati meningkat. Hal tersebut dikarenakan faktor ketidaktersediaan nutrisi baru dan terakumulasinya produk buangan yang bersifat

toksik dalam lingkungan.

Tahap berikutnya adalah pembuatan suspensi bakteri. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk memperoleh jumlah bakteri yang diinginkan. Koloni bakteri yang berada pada media peremajaan bakteri dengan usia 24 jam diambil menggunakan jarum ose kemudian disuspensikan pada tabung berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% steril. Kekeruhan bakteri uji yang digunakan disetarakan dengan pembanding kekeruhan Mc Farland no. 0,5 yaitu setara dengan jumlah 1×10^8 bakteri/mL.

Hasil Pembuatan Media

Media yang dibuat pada penelitian ini adalah media *Mueller-Hinton Agar* (MHA). Tahapan pembuatan media dilakukan dengan menimbang masing-masing media instan *Mueller-Hinton Agar* (MHA) sebanyak 38 g yang dilarutkan dalam 1 liter akuades, lalu dipanaskan dengan tujuan untuk mempercepat proses kelarutan, selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media pertumbuhan harus dapat dijamin tingkat kesterilannya guna memperoleh hasil uji yang maksimal, hal tersebut karena bakteri harus memiliki nutrisi untuk kesuburan pertumbuhannya. Tujuan tahapan prosedur pembuatan media yang benar diharapkan dapat memperoleh media bebas mikroorganisme yang tidak diinginkan. Pengayaan bakteri menggunakan media *Nutrient Broth* yaitu jenis media cair yang digunakan untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri yang berasal dari frozen stok (-20°C) yakni bakteri *B cereus* dan Bakteri *S aureus* yang merupakan hasil isolasi dari pasien Ulkus diabetik derajat III dan IV Wagner. Selama pengujian digunakan kontrol media sebagai kontrol negatif untuk menjamin kondisi dan hasil pengujian bebas kontaminasi.

Pengujian aktivitas antibakteri adalah teknik untuk mengukur berapa besar potensi atau konsentrasi suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme berdasarkan acuan ketentuan kekuatan aktivitas antibakteri dari diameter zona hambatan yang terbentuk (22). Adapun dalam pengujian menggunakan metode spotless difusi tanpa menggunakan kertas cakram/kertas disk, karena sifat basis yang cenderung berlemak sehingga akan sulit untuk berdifusi kedalam kertas dan akan mempengaruhi ukuran zona hambat yang ditimbulkan.

Tabel 1. Ketentuan Kekuatan Antibakteri (22)

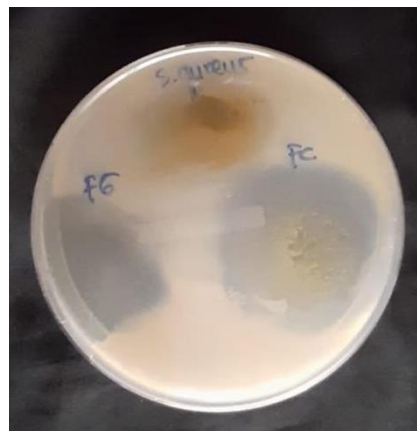
No.	Daerah Hambatan	Ketentuan
1.	> 20 mm	Sangat kuat
2.	10-20 mm	Kuat
3.	5-10 mm	Sedang
4.	< 5 mm	Lemah

Parameter yang dapat dilihat pada pengujian ini adalah terbentuknya zona bening disekitar cakram. Fraksi cengkokodok diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cereus*. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan fraksi kombinasi adalah basis dari masing-masing sediaan kombinasi yaitu kombinasi surfaktan, ko surfaktan serta minyak dari hasil orientasi formula menggunakan Desain *Expert Software*. Penelitian ini ditemukan adanya zona hambat pada basis formula yang kemungkinan berasal dari aktivitas minyak vco yang digunakan didalam basis kombinasi yang juga memiliki aktivitas antibakteri sehingga dilakukan pengujian kembali dengan menggunakan kontrol negatif dari basis sediaan masing-masing.

Gambar 1. Pengujian aktivitas sediaan kombinasi terhadap *Bacillus cereus*



Gambar 2. Pengujian aktivitas sediaan kombinasi terhadap *Staphylococcus aureus*



Hasil yang dapat diamati dari masing-masing perolehan diameter zona hambat pada penelitian ini jika mengacu pada tabel di atas maka termasuk ke dalam kelompok aktivitas antibakteri yang kuat dan sangat kuat dalam menghambat maupun membunuh bakteri patogen. Konsentrasi mikroba pada permukaan medium, kedalaman medium pada cawan petri, nilai pH dari medium serta

kondisi aerob/anaerob merupakan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi ukuran zona hambat, beberapa faktor tersebut harus selalu dikontrol. Konsentrasi mikroba uji pada permukaan medium mempengaruhi ukuran zona hambatan karena semakin tinggi konsentrasi mikroba maka zona penghambatan akan semakin kecil. Kedalaman medium pada cawan petri mempengaruhi ukuran zona hambatan karena semakin tebal medium pada cawan petri maka zona hambat akan semakin kecil. Kepadatan atau viskositas media biakan, kecepatan difusi antibiotik, dan interaksi antibiotik dengan media dapat mempengaruhi ukuran zona hambat.

Dalam penelitian ini menggunakan dua metode yaitu metode difusi dan metode dilusi untuk dapat menelusuri aktivitas dari sediaan kombinasi dari masing-masing antibiotik yaitu kombinasi fraksi dengan antibiotik siprofloksasin maupun kombinasi fraksi dengan antibiotik gentamisin terhadap dua jenis bakteri patogen yang diisolasi dari luka kaki pasien ulkus diabetik. Metode difusi digunakan untuk menentukan sensitivitas mikroba terhadap suatu agen antimikroba. Kertas cakram digunakan pada pengujian sensitivitas dengan metode difusi. Kertas cakram dimasukkan ke media agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri. Senyawa uji ditambahkan kedalam media agar tersebut. Diindikasikan terdapat hambatan pertumbuhan bakteri pada area yang jernih oleh antimikroba (23). Keuntungan metode ini adalah dapat dilakukan pengujian secara serentak dalam jumlah yang besar serta tidak memerlukan tenaga yang banyak, artinya variasi konsentrasi yang digunakan cenderung lebih banyak dapat dilakukan dalam waktu pengujian yang singkat jika dibandingkan dengan penggunaan metode difusi. Dalam penelitian juga dilakukan orientasi awal dengan menggunakan metode difusi akan tetapi ukuran zona yang ditemukan pada saat pengamatan beberapa perlakuan masih belum stabil sehingga dilakukan metode dilusi untuk mengkonfirmasi aktivitas dari kedua sediaan. Selain itu juga zona hambat yang diamati pada metode difusi berukuran cukup besar sehingga ketika dilakukan pengamatan dalam satu petri ukuran zona saling bergabung (*overlapping*) sehingga cukup menyulitkan dalam pengukuran menggunakan jangka sorong. Oleh karena itu untuk pengujian juga dilanjutkan dengan menggunakan metode dilusi cair (24).

Pada pengujian dengan menggunakan metode dilusi menggunakan jenis media yang berbeda dengan metode difusi yaitu menggunakan jenis media cair yaitu media *Nutrient Broth* (NB). Metode dilusi juga merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui efektivitas senyawa terhadap aktifitas suatu mikroorganisme. Parameter yang digunakan yaitu nilai Konsentrasi Hambat

Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) (25). Metode dilusi sendiri dibagi menjadi 2, yaitu dilusi cair dan padat. Metode dilusi cair umumnya digunakan untuk memperhitungkan nilai Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menggunakan metode dilusi padat. Keuntungan metode ini adalah beberapa mikroba uji dapat diuji dengan menggunakan satu titik konsentrasi (26). Berdasarkan hasil pengamatan ditemukan bahwa mulai dari pengkombinasian 1:1; 1:2 dan 1:4 menunjukkan adanya zona hambat fraksi kombinasi daun cengkodok dengan gentamisin dimana ukuran zona hambat semakin meningkat sesuai dengan pertambahan konsentrasi pengkombinasian.

Tabel 2. Hasil Zona Hambat Konsentrasi Fraksi dan Gentamisin terhadap Bakteri *B.cereus* dan *S. aureus* dengan metode difusi

Konsentrasi Fraksi - Gentamisin	<i>B. cereus</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
1:1	15 ; 14,8 ; 15	13,3 ; 14 ; 13,5
1:2	12,2 ; 12 ; 12,1	9,1 ; 9 ; 7
1:4	10 ; 9,8 ; 9	8,4 ; 8,6 ; 8,5
Kontrol Fraksi	7,2 ; 6,4 ; 7	8,2 ; 8,2 ; 8
Kontrol Basis	0	0

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara mengukur diameter zona jernih (zona hambat). Hal ini didasarkan pada besarnya zat aktif yang terlepas pada daerah sekitar cakram atau spot. Pada penelitian ini dilakukan 5 perlakuan, yaitu perbandingan antara fraksi-gentamisin 1:1, perbandingan antara fraksi-gentamisin 1:2, perbandingan antara fraksi-gentamisin 1:4, fraksi daun cengkodok sebagai kontrol fraksi, kombinasi surfaktan, ko surfaktan serta minyak dari hasil orientasi formula sebagai kontrol basis. Tujuan dari variasi konsentrasi tersebut untuk membandingkan aktivitas dari setiap konsentrasi yang bersifat antibakteri terhadap bakteri *B. cereus* dan *S. aureus*. Setiap kelompok perlakuan diuji sebanyak tiga kali. Pengulangan ini dimaksudkan untuk menghasilkan data yang konsisten serta hasil yang diperoleh bukan dikarenakan faktor peluang melainkan pengaruh dari perlakuan uji. Berdasarkan hasil pengamatan ditemukan bahwa mulai dari pengkombinasian 1:1; 1:2 dan 1:4 menunjukkan adanya zona hambat fraksi kombinasi daun cengkodok dengan gentamisin dimana ukuran zona hambat semakin menurun sesuai dengan pertambahan konsentrasi pengkombinasian.

Pada tabel ke-2 merupakan hasil dari uji aktivitas fraksi dan antibiotik gentamisin terhadap bakteri *B.cereus* dan *S. aureus*. Metode yang digunakan pada pengujian ini merupakan metode spot difusi. Metode ini akan membentuk area jernih pada area yang diketahui terdapat hambatan oleh aktivitas fraksi dan antibiotik gentamisin. Pada konsentrasi fraksi dan gentamisin 1:1 menunjukkan aktivitas zona

hambat yang lebih besar dibandingkan dengan perbandingan fraksi dan gentamisin yang lain. Hal ini membuktikan bahwa aktifitas antibakteri tidak dipengaruhi oleh konsentrasi gentamisin.

Tabel 3. Hasil Zona Hambat Konsentrasi Fraksi dan Siprofloksasin terhadap Bakteri *B.cereus* dan *S. aureus* dengan metode difusi

Konsentrasi Fraksi - Siprofloksasin	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
1:1	18,7 ; 19 ; 18,5	15,6 ; 15,2 ; 15,5
1:2	15 ; 15,3 ; 15,5	13 ; 13,5 ; 13,
1:4	13,3 ; 14 ; 14	11 ; 11,2 ; 11
Fraksi	12 ; 12,3 ; 13	10,8 ; 10 ; 10,2
Kontrol Basis	0	0

Pada tabel 3 menunjukkan hasil uji aktivitas fraksi dan antibiotik siprofloksasin terhadap bakteri *B. cereus* dan *S. aureus* dengan metode spot difusi. Konsentrasi fraksi dan siprofloksasin yang digunakan yaitu perbandingan konsentrasi fraksi dan siprofloksasin adalah 1:1, konsentrasi fraksi dan siprofloksasin 1:2, perbandingan antara fraksi-gentamisin 1:4, fraksi daun cengkodok sebagai kontrol fraksi, kombinasi surfaktan, ko surfaktan serta minyak dari hasil orientasi formula sebagai kontrol basis. Setiap konsentrasi kelompok diuji sebanyak 3 kali. Didapat hasil konsentrasi fraksi dan siprofloksasin 1:1 menunjukkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan perbandingan fraksi dan siprofloksasin lainnya, sehingga aktivitas antibakteri tidak dipengaruhi oleh konsentrasi siprofloksasin. Berdasarkan hasil pengamatan ditemukan bahwa mulai dari pengkombinasian 1:1; 1:2 dan 1:4 menunjukkan adanya zona hambat fraksi kombinasi daun cengkodok dengan Siprofloksasin dimana ukuran zona hambat semakin menurun sesuai dengan pertambahan konsentrasi pengkombinasian.

Tabel 4. Hasil Zona Hambat Konsentrasi Fraksi dan Gentamisin terhadap Bakteri *B. cereus* dan *S. aureus* dengan metode dilusi

Konsentrasi Fraksi - Gentamisin	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
1:1	Jernih	Jernih
1:2	Jernih	Jernih
1:4	Jernih	Jernih
Kontrol Media/Basis	Jernih	Jernih
Kultur	Keruh	Keruh

Tabel 4 menunjukkan hasil zona hambat konsentrasi fraksi dan gentamisin terhadap baktei *B. cereus* dan *S. aureus* dengan metode dilusi. Pada metode dilusi dilakukan pengamatan ada tidaknya zona hambat melalui pengamatan

kekeruhan. Bila terdapat zona hambatan yang positif akan terbentuk wilayah jernih pada pengamatan. Pada tabel 3 terlihat bahwa perbandingan konsentrasi fraksi dan gentamisin 1:1, konsentrasi fraksi dan gentamisin 1:2, konsentrasi fraksi dan gentamisin 1:4, dan kontrol media menunjukkan wilayah jernih. Hal ini menunjukkan terdapat zona hambat pada konsentrasi tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan ditemukan bahwa mulai dari pengkombinasian 1:1; 1:2 dan 1:4 menunjukkan adanya zona hambat fraksi kombinasi daun cengkodok dengan Siprofloksasin dimana ukuran zona hambat semakin meningkat sesuai dengan pertambahan konsentrasi pengkombinasian.

Tabel 5. Hasil Zona Hambat Konsentrasi Fraksi dan Siprofloksasin terhadap Bakteri *B..cereus* dan *S. aureus* dengan metode dilusi

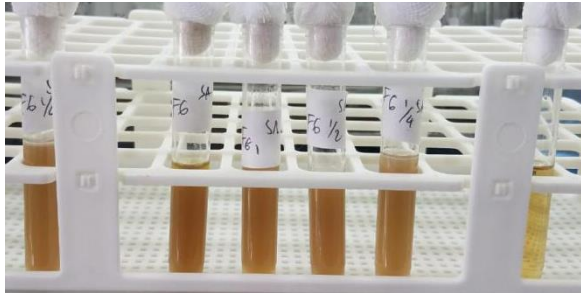
Konsentrasi Fraksi - Siprofloksasin	<i>B.cereus</i>	<i>S. aureus</i>
1:1	Jernih	Jernih
1:2	Jernih	Jernih
1:4	Jernih	Jernih
Kontrol Media/Basis	Jernih	Jernih
Kultur	Keruh	Keruh

Tabel 5 menunjukkan hasil zona hambat konsentrasi fraksi dan siprofloksasin terhadap baktei *B.cereus* dan *S. aureus* dengan metode dilusi. Pengamatan yang dilakukan adalah ada tidaknya wilayah jernih pada media. Pada tabel 4 terlihat bahwa perbandingan konsentrasi fraksi dan siprofloksasin 1:1, konsentrasi fraksi dan siprofloksasin 1:2, konsentrasi fraksi dan siprofloksasin 1:4, dan kontrol media menunjukkan wilayah jernih. Hal ini menunjukkan terdapat zona hambat pada konsentrasi tersebut.

Gambar 3. Pengujian kombinasi sediaan dengan metode dilusi terhadap bakteri *S. aureus*



Gambar 4. Pengujian kombinasi sediaan nanaospray dengan metode dilusi terhadap bakteri *B. cereus*



Penelitian pada Tahun I juga menyebutkan bahwa hasil kombinasi dengan konsentrasi $\frac{1}{4}$ kali MIC fraksi cengkodok dan ciprofloksasin masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *B. cereus*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa MIC kombinasi fraksi cengkodok dan ciprofloksasin yaitu $\frac{1}{4}$ kali MIC. Hasil nilai FICI kombinasi ciprofloksasin dan fraksi cengkodok pada bakteri *Bacillus cereus* menghasilkan karakteristik sinergis. Karakteristik sinergis mempunyai nilai FICI 0,5. Hasil sinergis menunjukkan bahwa kombinasi fraksi cengkodok dan ciprofloksasin efeknya lebih besar dibanding jumlah kedua antimikroba. Ciprofloksasin bekerja menghambat replikasi DNA dengan mengikat diri pada sebuah enzim yang disebut DNA gyrase yang menyebabkan keretakan ganda pada kromosom bakteri (27). Fraksi cengkodok dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan oleh adanya senyawa fraksi cengkodok yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri yaitu flavonoid, fenol dan terpenoid. Senyawa tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki mekanisme kerja untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid sendiri merupakan senyawa turunan dari fenol yang bersifat sebagai koagulator protein. Senyawa flavonoid mampu untuk membentuk kompleks dengan ikatan hidrogen bersama protein sel bakteri yang dapat menyebabkan ketidakstabilan struktur dinding sel dan membrane sel bakteri dan menyebabkan lisis kandungan flavonoid pada daun cengkodok (*Melastoma malabathricum* L.) yaitu *quercetin*. Kandungan flavonoid termasuk *quercetin* dapat menghambat DNA gyrase *E. coli* dengan menggunakan kadar yang berbeda.

Struktur bakteri dapat berubah dikarenakan terjadinya denaturasi protein akibat senyawa flavonoid (28). Melisis sel bakteri dengan merusak porin merupakan mekanisme terpenoid sehingga dapat berfungsi sebagai antibakteri (11). Mekanisme fenol sebagai antibakteri dengan mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan kebocoran intraseluler (29). Penggabungan kedua mekanisme tersebut dapat meningkatkan aktivitas antibakteri keduanya terhadap

bakteri *B. cereus*. Sehingga dalam mengkombinasikan fraksi cengkodok dan ciprofloksasin dapat memiliki efek yang sinergis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *B. cereus*.

Diameter yang dihasilkan oleh kombinasi fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat terhadap bakteri *E. coli* terjadi peningkatan dibandingkan diameter fraksi cengkodok maupun gentamisin sulfat yang digunakan secara tunggal. Kombinasi fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat menghasilkan nilai FICI sebesar 0,5 yang berarti memiliki karakteristik kombinasi sinergis pada kedua bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa efek kombinasi lebih besar dibandingkan fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat secara tunggal. Penelitian yang telah dilakukan menyebutkan bahwa Kombinasi fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat menghasilkan nilai FICI sebesar 1 dan memiliki karakteristik kombinasi indiferent pada kedua bakteri. Hal ini berarti bahwa efek kombinasi tidak lebih besar dibandingkan fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat secara tunggal, sehingga diperoleh kesimpulan bahwa penggunaan secara tunggal masing-masing lebih efektif dibandingkan dengan penggunaan secara kombinasi. Diameter yang dihasilkan oleh kombinasi fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat terhadap bakteri *B. cereus* terjadi peningkatan dibandingkan diameter fraksi cengkodok maupun gentamisin sulfat yang digunakan secara tunggal. Penelitian sebelumnya juga menyatakan bahwa kombinasi fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat menghasilkan nilai FICI sebesar 0,5 yang berarti memiliki karakteristik kombinasi sinergis pada kedua bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa efek kombinasi lebih besar dibandingkan fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat secara tunggal.

Pengkombinasian dengan karakteristik sinergis dikarenakan kandungan metabolit sekunder didalam cengkodok yang berperan penting dalam aktivitas sebagai antibakteri seperti senyawa tanin dan flavonoid yang memiliki mekanisme perusakan membran sel bakteri sehingga terjadi pengeluaran senyawa intraseluler yang akan menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh (30). Gentamisin sulfat sebagai antibakteri dengan mekanisme masuk kedalam sel dan berikatan kuat pada komponen sisi tRNA dibagian 16S RNA pada subunit ribosom 30S yang akan menyebabkan kesalahan hasil terjemahan dan mengganggu sistem kerja sel dalam bakteri tersebut (31). Penggabungan kedua mekanisme tersebut akan dapat meningkatkan aktivitas sebagai antibakteri secara sinergis. Pengkombinasian fraksi dengan antibiotik gentamisin dengan metode difusi maupun metode dilusi menunjukkan adanya potensi aktivitas sediaan sebagai antibakteri terhadap bakteri *B. cereus* maupun bakteri *S aureus*.

Bakteri *B. cereus* juga merupakan bakteri Gram positif. Berdasarkan penelitian sebelumnya juga ditemukan bahwa *S. aureus* cenderung memiliki tingkat resistensi yang lebih tinggi terhadap antibakteri (32), sehingga hasil kombinasi fraksi cengkodok dan gentamisin sulfat terhadap bakteri *S. aureus* memiliki karakteristik indifferent, tetapi masih menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada pengujian yaitu menunjukkan pengamatan jernih dengan metode dilusi sehingga sediaan formulasi kombinasi menunjukkan efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen yaitu *S. aureus* dan *B. cereus*.

Formulasi sediaan yang terdiri dari campuran antibiotik gentamisin sulfat dan fraksi cengkodok memiliki aktivitas antibakteri baik terhadap bakteri *B. cereus* maupun *S. aureus*. Adanya basis sediaan juga dapat membantu difusi zat aktif kedalam permukaan kulit. Pada formulasi sediaan yang terdiri dari campuran antibiotik siprofloksasin dengan fraksi cengkodok diperoleh aktivitas antibakteri tidak dipengaruhi oleh konsentrasi siprofloksasin sehingga aktivitas yang ditunjukkan dominan berasal dari fraksi cengkodok. Adanya basis sediaan kombinasi fraksi dan siprofloksasin yang berbeda juga dapat membantu difusi zat aktif kedalam permukaan kulit sehingga meningkatkan efektivitas sediaan jauh lebih baik dibandingkan kombinasi sediaan fraksi dengan gentamisin. Pengkombinasian ini diharapkan dapat meningkatkan kesembuhan pasien ulkus diabetik dan dapat mengurangi tingkat kematian akibat infeksi bakteri yang dapat memperparah penyakit ulkus diabetik dimasyarakat. mampu mengatasi kejadian resistensi bakteri terhadap antibiotik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa kombinasi fraksi daun cengkodok dengan antibiotik gentamisin dan siprofloksasin memiliki aktivitas lebih baik terhadap bakteri *B. cereus* dan *S. aureus* dibanding fraksi daun cengkodok, gentamisin dan siprofloksasin tunggal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abidin K. Faktor Penghambat Proses Proliferasi Luka Diabetic Foot Ulcer pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe II di Klinik Kitamura Pontianak. *J ProNers* 2013;1(1).
2. Purwanti LE, S M. Faktor Risiko Komplikasi Kronis (Kaki Diabetik) dalam Diabetes Mellitus Tipe 2. *Indones J Heal Sci* 2016;7(1).
3. Cahyopectro A, Sarimin S, Seweng A. Identifikasi pola kuman dan tes resistensi antibiotic pada penderita ulkus dekubitus di RS Wahidin Sudirohusodo [Thesis]. Makassar: Universitas Hasanuddin; 2014.
4. Sinto R. Peran Penting Pengendalian Resistensi Antibiotik pada Pandemi COVID-19. *J Penyakit Dalam Indones* 2020;7(4):194–5.
5. Fauzia D. Strategi Optimasi Penggunaan Antibiotik. *J Ilmu Kedokt* 2017;9(2):55.
6. Izzati UZ. Efektivitas Penyembuhan Luka Bakar Salep Ekstrak Etanol Daun Senggani (*Melastoma Malabathricum* L.) Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Jantan Galur Wistar. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*. 2015;3(1).
7. Nurdiana S, Marziana N. Wound Healing Activities of *Melastoma malabathricum* Leaves Extract in Sprague Dawley Rats. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013;20(2):20–3.
8. Pratiwi L, Sari R, Apridamayanti P. Synergistic Interaction of Ethyl Acetate Fraction from *Melastoma malabathricum* L. leaves in Combination with Ciprofloxacin and Gentamicin against *Escherichia coli* Isolated from Diabetic Foot Ulcer Patients. *Trad Med J* 2021;26(1):63–70.
9. Chusnie T, Lamb A. Review Antimicrobial Activity of *Melastoma malabathricum* L. Assam University Journal of Science and Technology. *Biol Enviromental Sci* 2011;7(1):76–8.
10. Carolia N, Noventi W. Potensi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) sebagai Alternatif Terapi *Acne vulgaris*. *J Major* 2016;5(1):140–5.
11. Cowan MM. Plant products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4):564–82.
12. Shah P, Bhalodia D, Shelat P. Nanoemulsion: a Pharmaceutical Review. *Syst Rev Pharm* 2010;1(1).
13. Amrutkar C, Salunkhe K, Chaudhari SR. Review on Self Nanoemulsifying Drug Delivery System. *AJPTR* 2014;4:2249–3387.
14. Pratiwi L, Sari R, Apridamayanti P. Design and Characterization of Nanospray with Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System using Sinergistic Combination of *Melastoma malabathricum* L. Fraction and Gentamicin. *Int J Appl Pharm* 2021;13(2).
15. Mosquera OM, Correa YM, Buitrago DC, Niño J. Antioxidant Activity of Twenty Five Plants from Colombian Biodiversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102(5):631–4.
16. Phromsopha T, Baimark Y. Diffusion Method for Drug Delivery. *Biotechnology* 2010;9(1):61–6.
17. Sari IWA. Analisis Kadar Siprofloksasin dalam Sediaan Tablet dengan Metode Spektroskopi Near-Infrared dan Kemometrik. *Artik Ilm Has Penelit Mhs* 2013;1–6.

18. Patel J, Kevin G, Patel A, Raval M, Sheth N. Design and Development of a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Telmisartan for Oral Drug Delivery. *Int J Pharm Investig* 2011;1(2):112.
19. Date AA, Nagarsenker MS. Design and Evaluation of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Cefpodoxime Proxetil. *Int J Pharm* 2007;329(1–2):166–72.
20. Senapati PC, Sahoo SK, Sahu AN. Mixed Surfactant Based (SNEDDS) Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System Presenting Efavirenz for Enhancement of Oral Bioavailability. *Biomed Pharmacother* 2016;80:42–51.
21. Cappuccino JG, Sherman N. *Microbiology: a Laboratory Manual*. San Fransisco: 2005.
22. Davis WW, Stout TR. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay: I. Factors Influencing Variability and Error. *Appl Microbiol* 1971;22(4):659–65.
23. Katrin D, Idawati N, Sitorus B. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Daun Malek (*Litsea graciae* Vidal) terhadap Bakteri *Stapylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J Kim Khatulistiwa* 2015;4(1).
24. Listari Y. *Efektivitas penggunaan metode pengujian antibiotik isolat Streptomyces dari rizosfer familia poaceae terhadap Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surakarta Perpustakaan).
25. Fatisa Y, Endah. *Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit dan Biji Buah Pulasan (Nepehelium mutabile)*. In: Prosiding Seminar Nasional IAIN Sultan Thaha Saifuddin. Jambi: 2013.
26. Pratiwi ST. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga; 2008.
27. Sumampouw OJ. Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Penyebab Diare Balita di Kota Manado. *J Pharm Sci* 2018;2(1):104–10.
28. Tjay TH, Rahardja K. *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya*. Edisi 4. 2007.
29. Setyaningsih D, Nurmilah OY, Windarwati S. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). *J Teknol Pangan* 2013;4(2).
30. Robinson T. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. 14th ed. Bandung: ITB; 1995.
31. Akiyama H, Fuji K, Yamasaki O, Iwatsuki T. Antibacterial Action of Several Tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:487–91.
32. Wattimena JR, Sugiarto NC, Widiyanto MB, Sukandar EY, Soemardji AA, Setiadi AR. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*. Yogyakarta: Gajah Mada University; 1991.