

**Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Fraksi Kloroform Ekstrak
Etanolik Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata* Duch Poir)**

*Antioxidant and Antibacterial Activity of Yellow Pumpkin Seeds (*Cucurbita moschata* Duch Poir) Chloroform Fraction Ethanolic Extract*

**Sri Tasminatun, M.Si., Apt, Rifki Febriansah, M.Sc., Apt, Desy Putri Setiani,
Dr. Alfaina Wahyuni, Sp. OG**

Pharmacy Study Programme Faculty of Medical and Health Science,
Muhammadiyah University of Yogyakarta

ABSTRACT

Infection is a disease that many people suffering and continuously develops. Yellow pumpkin seeds (*Cucurbita moschata* Duch Poir) contain alkaloids and flavonoids. These compounds can give the antioxidant and antibacterial effects. This research aims to find the antioxidant and antibacterial effects of *C. moschata* seeds chloroform fraction toward the *Staphylococcus aureus* bacteria.

The *C. moschata* seeds were extracted by the maceration method using 70% ethanol as the solvent. The extract was fractionated using chloroform. The antioxidant activity *C. moschata* seeds chloroform fraction was tested uses the DPPH method (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*). The antibacterial activity was tested using disc diffusion method with tetracycline as the positive control toward the *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 bacteria. The identification of the active compounds uses Thin Layer Chromatography method. The % inhibition data from antioxidant test shown in linear regression curve. The equation result from linear regression curve was used to measuring IC₅₀ value. The antibacterial activity test was analyzed by measuring the clear zone diameter. The active compounds identification was analyzed by counting the emerging R_f spot value.

C. moschata seeds chloroform fraction in the concentration of 100; 200; 300; and 400 µg/ ml had weak antioxidant activity with the IC₅₀ value was 356.33 µg/ ml. *C. moschata* seeds chloroform fraction in the concentration of 5%; 10%; 25%; and 50% had a weak antibacterial activity toward *S. aureus*. The chloroform fraction contained flavonoids and alkaloids.

Keywords: antibacterial, antioxidant, *Cucurbita moschata*, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia yang disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, riketsia, jamur, dan protozoa.¹ Penyakit infeksi telah menyebabkan kematian sebesar 13

juta orang di seluruh dunia setiap tahun, terutama di negara-negara berkembang seperti Indonesia.² Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Beberapa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya *Staphylococcus aureus*. Beberapa antibiotik yang dapat digunakan untuk menghambat *S.*

aureus antara lain ampisilin, penisilin, tetrasiklin, kloksasilin, sefalosporin, vankomisin, dan metisilin.³ Terapi infeksi dengan antibiotik dapat membawa masalah tersendiri, yaitu adanya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Upaya mencari alternatif lain dalam pengobatan infeksi adalah dengan penggunaan obat alam. Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan untuk pengobatan antiinfeksi adalah biji labu kuning. Antioksidan menjadi topik yang menarik baru-baru ini. Antioksidan dapat membantu melindungi tubuh manusia melawan kerusakan yang disebabkan oleh senyawa radikal bebas. Akibat reaktivitas yang tinggi, radikal bebas dapat merusak berbagai sel makromolekul, termasuk protein, karbohidrat, lemak dan asam nukleat.⁴ Radikal bebas dapat ditangkal atau diredam dengan pemberian antioksidan atau dengan mengkonsumsi antioksidan.⁵ Banyak penelitian telah membuktikan manfaat mengkonsumsi tanaman yang berkhasiat antioksidan, seperti dapat menurunkan resiko penyakit jantung, kanker, katarak dan penyakit degeneratif lain. Salah satu tumbuhan yang memiliki banyak manfaat adalah labu kuning. Selain buahnya, biji *C. moschata* juga bermanfaat bagi kesehatan. Dalam biji labu kuning terdapat kandungan seperti fitokimia (fitosterol); serat, *polyunsaturated fatty acids* (PUFA); dan antioksidan (vitamin C, vitamin E dan beta karoten).⁶ Biji labu kuning juga mengandung senyawa fenolik yang dapat berperan sebagai antibakteri melawan bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Klebsiella*

pneumonia.⁷ Pada penelitian ini akan dilakukan uji antioksidan dan antibakteri dari fraksi kloroform ekstrak etanolik biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch Poir) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Uji dilakukan secara *in vitro* melalui uji antibakteri dengan metode difusi cakram dan uji antioksidan menggunakan metode DPPH untuk mengetahui potensi antibakteri dan antioksidan dari fraksi kloroform ekstrak tersebut. Penelitian ini diharapkan mampu membuktikan fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* sebagai agen antibakteri dan antioksidan yang potensial yang berasal dari bahan alam. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan menghambat radikal bebas melalui uji antibakteri dan antioksidan.

METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium FKIK UMY serta laboratorium Biologi Farmasi UGM. Alat penelitian yang digunakan antara lain seperangkat alat ekstraksi, alat gelas, spektrofotometri UV, *Laminar Air Flow* (LAF), mikropipet, cawan petri, timbangan, oven, autoklaf, inkubator. Bahan penelitian yang digunakan antara lain biji labu kuning, etanol 70%, metanol, kloroform, *Trypticase Soy Agar* (TSA), tetrasiklin, DMSO, serbuk DPPH, pereaksi dragendorff, FeCl₃, kuinin, rutin.

Ekstraksi biji *C. moschata*. Biji labu kuning dipanen dari daerah Salatiga. Biji *C. moschata*

dihaluskan kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Sebanyak 500 gram serbuk biji *C. moschata* dimasukkan kedalam 2,5 liter etanol 70% untuk dimaserasi. Maserat yang didapat difraksinasi dengan menggunakan pelarut kloroform dalam corong pisah dengan perbandingan 1:1. Fraksi kloroform biji *C. moschata* yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan evaporator.

Identifikasi senyawa aktif.

Identifikasi senyawa aktif menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 F₂₅₄ dan plat selulosa. Fase gerak yang digunakan adalah butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 4:1:5. Noda pada lempeng tipis diamati di bawah sinar UV, dan dilakukan penyemprotan dengan pereaksi dragendorff dan FeCl₃.

Uji aktivitas antioksidan. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Molyneux, 2004.⁹ DPPH 0,4 mM dibuat dengan melarutkan 15,77 mg serbuk DPPH ke dalam 100 ml metanol.¹⁰ Selanjutnya dibuat seri konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moschata* yaitu 100 µg/ml ; 200 µg/ml ; 300 µg/ml dan 400 µg/ml. Pembuatan blanko dengan mencampurkan 1 ml larutan DPPH dalam 5 ml metanol. Pembacaan panjang gelombang dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Sebanyak 5 mL larutan sampel dalam metanol dengan variasi konsentrasi 100, 200,300 dan 400 µg/mL dicampurkan dengan 1 mL larutan DPPH, kemudian campuran *divortex* dan didiamkan selama 30

menit. Persentase inhibisi diukur dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

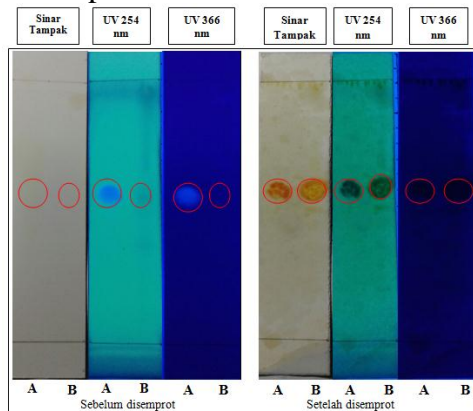
Data hasil penelitian yang diperoleh dibuat kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji dengan % inhibisi dan ditentukan nilai IC₅₀ dari persamaan regresi linier yang didapat..

Uji aktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *Kirby Bauer*/ difusi cakram. Alat dan bahan uji disterilkan terlebih dahulu. Bakteri uji diinokulasi pada medium *Nutrient Agar* (NA). Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 diambil kemudian dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% fisiologis steril sebanyak 1 mL. Suspensi didiamkan selama 2-3 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang telah diinkubasi diambil 1 mL kemudian dimasukkan dalam 9 mL *Brain Heart Infusion* (BHI) cair. Suspensi sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10⁸ CFU/mL.¹¹ Kontrol positif pada penelitian ini adalah tetrasiklin 0,2 mg/mL dibuat dengan melarutkan 0,4 ml tetrasiklin ad aquades sampai 5 mL.¹² Kontrol negatif yang digunakan adalah larutan DMSO. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara *paper disc* dengan direndam dalam keempat konsentrasi fraksi kloroform ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif selama 15 menit. Dengan menggunakan kapas lidi, suspensi bakteri diusap ke permukaan media secara merata. *Paper disc* yang telah direndam diletakkan di atas media pertumbuhan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan penggaris.

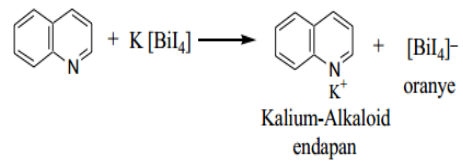
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji identifikasi senyawa kimia pada fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* diketahui bahwa fraksi kloroform ekstrak mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid ditunjukkan dari adanya bercak khas yang menunjukkan adanya senyawa tersebut. Profil kromatogram uji alkaloid dapat dilihat pada Gambar 1.



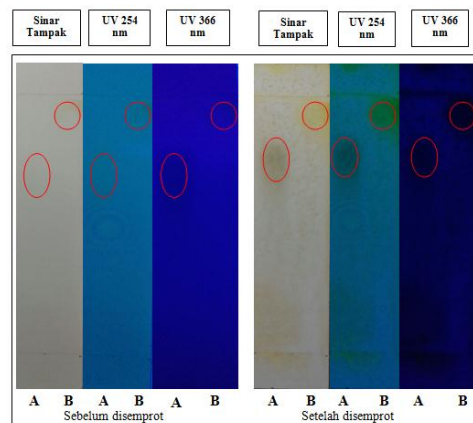
Gambar 1. Profil kromatogram senyawa alkaloid
Keterangan : Kuinin (A), fraksi kloroform biji *C. moschata* (B)

Uji alkaloid menggunakan pereaksi dragendorff. Hasil yang diperoleh untuk sampel fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* menunjukkan warna oranye yang menandakan terdapat senyawa alkaloid dalam sampel fraksi. Hal ini dikarenakan terjadi pengikatan ion K^+ pada nitrogen dalam cincin sehingga membentuk endapan berwarna oranye.¹³ Reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi dragendorff dapat dilihat pada Gambar 2.



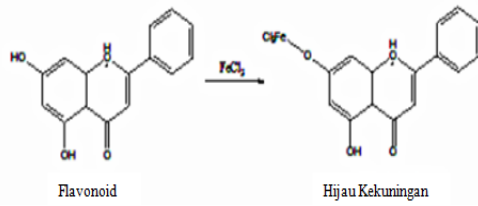
Gambar 2. Reaksi alkaloid dengan pereaksi dragendorff (Marliana, 2005)

Profil kromatogram uji KLT flavonoid dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Profil kromatogram senyawa flavonoid
Keterangan : Rutin (A), fraksi kloroform biji *C. moschata* (B)

Setelah disemprot dengan $FeCl_3$, pada sampel timbul noda berwarna kuning pada pengamatan dengan sinar tampak, berwarna hijau kekuningan pada UV 254 nm dan berwarna biru hitam pada UV 366 nm. Pada kuinin timbul noda dengan warna hijau kehitaman. Hal ini menegaskan adanya kandungan flavonoid pada fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata*.¹⁴ Reaksi senyawa flavonoid dengan $FeCl_3$ dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi flavonoid dengan pereaksi $FeCl_3$ (Lumbanraja, 2009)

Hasil uji KLT fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji KLT fraksi kloroform ekstrak etanolik biji labu kuning

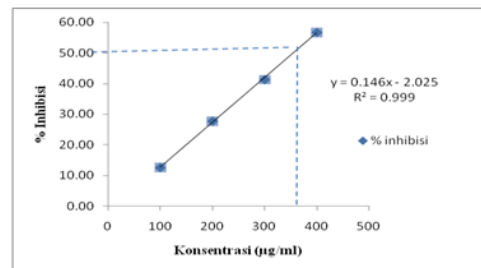
Kandungan Kimia	Rf (cm)	Sinar Tampak		UV 254		UV 366		Ket
		Tampa Pereaksi	Tambah Pereaksi	Tampa Pereaksi	Tambah Pereaksi	Tampa Pereaksi	Tambah Pereaksi	
Alkaloid	0,56	Kuning samar	Oranye	Biru hitam	Hijau hitam	Biru hitam	Biru hitam	+
Kuinin	0,56	-	Oranye	Biru	Hijau hitam	Biru	Biru	+
Flavonoid	0,93	Kuning muda	Kuning	-	Hijau kuning	Biru	Biru hitam	+
Rutin	0,75	Kuning muda	Hijau hitam	-	Hijau hitam	Biru	Biru hitam	+

Selanjutnya, untuk menguji aktivitas antioksidan pada fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* menggunakan metode DPPH. Metode DPPH dipilih karena memerlukan sedikit sampel, sederhana, mudah, cepat, dan peka untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam.¹⁵ DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazil) merupakan senyawa radikal bebas stabil. Prinsip dari metode DPPH adalah interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari warna ungu tua menjadi kuning terang. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimal

yaitu 515 nm.. Dari nilai absorbansi DPPH yang diperoleh dapat ditentukan persentase penghambatan radikal DPPH (% inhibisi). Dari nilai % inhibisi dapat ditentukan nilai IC_{50} .⁹ Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Biji *C. moschata* dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 5.

Tabel 2. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan fraksi kloroform biji *C. moschata*

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi	% Inhibisi
100	0,426±0,023	12,40±4,76
200	0,353±0,010	27,60±2,25
300	0,287±0,013	41,13±2,72
400	0,211±0,008	57,37±0,58



Gambar 5. Kurva regresi linier aktivitas antioksidan biji *C. moschata*

Dari persamaan $y = 0.146x - 2.025$ dengan $R^2 = 0.999$ diperoleh Nilai IC_{50} fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* adalah 356.33 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut ekstrak mampu menghambat 50% oksidasi. Menurut Ariyanto (2006), tingkat kekuatan antioksidan fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* tergolong lemah karena memiliki nilai $IC_{50} = 356.33$ µg/ml (>150 µg/ml).¹⁶ Lemahnya aktivitas

antioksidan dalam fraksi kloroform biji labu kuning disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor yang pertama adalah kandungan senyawa yang berperan sebagai antioksidan dalam biji *C. moschata* yakni vitamin C larut dalam fase air daripada kloroform sehingga aktivitas antioksidan dari fraksi kloroform biji *C. moschata* berkurang dan menyebabkan lemahnya aktivitas antioksidan. Faktor kedua yang menyebabkan lemahnya aktivitas antioksidan fraksi kloroform biji labu kuning yaitu diduga senyawa yang terkandung di dalam fraksi kloroform kemungkinan adalah flavonoid golongan flavanon. Senyawa flavanon pada umumnya memiliki aktivitas antioksidan yang lemah. Faktor yang menyebabkan lemahnya aktivitas antioksidan pada senyawa flavanon pada umumnya disebabkan oleh gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavanon hanya sedikit dan pada cincin C flavanon tidak memiliki ikatan ganda pada ikatan 2-3 gugus 4-okso, sehingga kemungkinan besar untuk menstabilkan struktur senyawanya yang kehilangan elektron dari proses donor hidrogen dalam struktur senyawa flavanon tidak terjadi.¹⁷ Dengan demikian senyawa golongan flavanon pada umumnya memiliki potensi aktivitas antioksidan yang lemah.

Uji aktivitas antibakteri fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* menggunakan metode difusi cakram. Metode ini dipilih karena hasil pembentukan zona bening lebih mudah untuk diamati dibandingkan dengan metode dilusi. Metode Kirby-Bauer digunakan untuk menentukan sensitifitas bakteri

patogen baik yang bersifat aerob maupun anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa antimikroba.¹⁸ Pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini juga dilakukan pada tetrasiklin sebagai kontrol positif. Tetrasiklin mempunyai kemampuan menghambat sintesis protein bakteri *S. aureus* dengan mencegah t-RNA aminoasil berikatan dengan ribosom.¹⁹ Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan DMSO bertujuan untuk memastikan bahwa aktivitas antibakteri pada saat penelitian berasal dari sampel uji. Hasil pengukuran zona inhibisi pada sampel fraksi kloroform biji *C. moschata* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengukuran zona inhibisi antibakteri

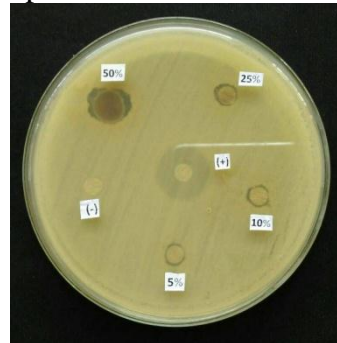
Konsentrasi	Diameter Hambatan (mm)			
	I	II	III	Rata-rata
5 %	2	2,25	2,25	2,33
10 %	2,5	2,6	2,5	2,67
25 %	2,6	2,5	3	2,7
50 %	6	5,25	5,7	5,65
Tetrasiklin 0,02%	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	-

Hasil pengujian fraksi kloroform biji *C. moschata* pada Tabel 3 menunjukkan bahwa larutan uji dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 pada konsentrasi terkecil yaitu 5%. Hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terbentuk disekitar keempat konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moschata*. Menurut Jawetz *et al.*, (2005), pada bakteri gram positif, struktur dinding sel lebih sederhana yaitu berlapis tunggal dengan kandungan lipid rendah (1-4%) sehingga memudahkan bahan bioaktif masuk ke dalam sel. Pada kontrol positif tetrasiklin tidak dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 secara sempurna.

Terbentuknya diameter disekitar *paper disc* akan tetapi masih terdapat bakteri yang tumbuh menunjukkan bahwa beberapa *Staphylococcus aureus* telah mengalami resistensi terhadap antibiotik tetrasiklin. Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik terjadi dengan cara penginaktifan obat, perubahan target atau sirkulasi enzim, berkurangnya akumulasi obat oleh adanya sel resisten, variasi jalur metabolisme.²⁰ Resistensi *S. aureus* terhadap tetrasiklin terjadi melalui mekanisme efluks yang dikendalikan gen *tetA* dan *tetB* dan proteksi ribosom oleh protein *TetM*, *TetO* dan *TetS* dan sebagainya yang akan melekat pada ribosom sehingga tetrasiklin akan terlepas dari ribosom dan menjadi tidak aktif.²¹ Bakteri mengembangkan pompa efluks yang aktif mengeluarkan antibiotik dari sitoplasma lebih cepat daripada kecepatan obat tersebut berdifusi masuk. Oleh karena itu, konsentrasi obat di dalam bakteri menjadi terlalu rendah, sehingga menjadi tidak efektif.²²

Nilai rata-rata diameter hambatan fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* dengan konsentrasi 5% , 10% , 25%, dan 50% secara berturut- turut sebesar 2,33 mm ; 2,67 mm ; 2,70 mm dan 5,65 mm masuk dalam kategori antibakteri lemah dengan diameter hambat ≤ 5 mm.²³ Dari hasil pengujian ini dapat disimpulkan bahwa keempat konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moshata* yaitu 5% , 10%, 25% dan 50% memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 yang tergolong lemah. Bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047

telah mengalami resistensi terhadap antibiotik tetrasiklin. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil uji antibakteri fraksi kloroform biji *C. moschata* terhadap *S. aureus* FNCC 0047
Keterangan: Tetrasiklin (+), DMSO (-)

Biji *C. moschata* mengandung komponen zat aktif yaitu flavonoid dan alkaloid. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler.²⁴ Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan melekatkan diri diantara DNA. Adanya zat yang berada diantara DNA akan menghambat replikasi DNA, akibatnya terjadi gangguan replikasi DNA yang akan menyebabkan kematian sel.²⁵ Pada penelitian yang dilakukan, keempat seri konsentrasi fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang tergolong lemah.²³ Hal ini dikarenakan senyawa flavonoid dan alkaloid yang terkandung dalam fraksi kloroform biji labu kuning pada konsentrasi 5% , 10%, 25% dan 50% masih sedikit. Semakin tinggi konsentrasi suatu larutan maka akan

semakin tinggi zat-zat aktif yang terkandung didalamnya.

KESIMPULAN

Fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *Cucurbita moschata Duch Poir* memiliki aktivitas antioksidan tergolong lemah dengan Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*) sebesar 356,33 $\mu\text{g/ml}$. Pada uji aktivitas antibakteri, Fraksi kloroform ekstrak etanolik *Cucurbita moschata Duch Poir* dengan konsentrasi 5% , 10%, 25% dan 50% memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 yang tergolong lemah. Hasil identifikasi uji senyawa menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid dimana aktivitas antioksidan dan antibakterinya berasal dari kedua senyawa tersebut.

SARAN

Penelitian lanjutan terhadap aktivitas antioksidan dan antibakteri fraksi kloroform ekstrak etanol biji *C. moschata* tidak perlu dilakukan karena aktivitas antioksidannya tergolong lemah. Jika ingin mendapatkan aktivitas antioksidan dan antibakteri yang kuat bisa melakukan penelitian lanjutan dengan mengganti pelarut yang digunakan atau dengan mengekstraksi simplisia yang lain.

UCAPAN TERIMAKASIH

Dirjen Dikti yang telah memberi dana penelitian melalui program Hibah Bersaing.

RUJUKAN

- ¹Gibson, J. M.,1996, *Mikrobiologi & Patologi Modern untuk Perawat*, 1, 23 Cetakan Pertama, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- ²Salni., Marisa, H.,Mukti, W. R. 2011. *Isolasi senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (Pithecolobium lobatum Benth) dan Penentuan Nilai KHM-nya*. Universitas Sriwijaya Sumatra Selatan. Indonesia. (38-41)
- ³Jawetz, E., Melnick, J., dan Adelberg, E., (2005), *Mikrobiologi Kedokteran*, 362, Salemba Medika, Jakarta.
- ⁴Yuhernita, Juniarti, (2011), Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Makara Sains*, Vol. 15, No.1, Hal. 48-52
- ⁵Halliwel B. 2007. *Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health*. *J. Cardiovascular Research* 73:341-347.
- ⁶U.S. Department of Agricultural, Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23.2010.
- ⁷Abd EI-Aziz and H.H. Abd EI-Kalek.(2011). Antimicrobial proteins and oil seeds from pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Nature and Science*, 2011;9 (3). (ISSN: 1545-0740).Online:

- <http://www.sciencepub.net/nature>
- ⁸Handayani, D., Deapati, M., Marlina, Mellan, (2005). Skrining Aktivitas Antibakteri Beberapa Biota Laut dari Perairan Pantai Painan, Skripsi, Sematera Barat.: Universitas Andalas Malang
- ⁹Molyneux, P., (2004), The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J. Sci. Technol., pp. 26, 211-219.
- ¹⁰Sumarny, R., Nurhidayati, L., Sofiah, S., Fatimah., (2014). Antioxidant activity of Mangosteen (*Garcinia mangostana L.*) Fruit Rind Extract in Oral Solution Dosage Form. *Medicinal Plants & Traditional Medicine*, Tawangmangu. Central Java Indonesia, June 4th-6th 2014
- ¹¹Sutton, S. (2011). Measurement of Microbial Cell by Optical Density. *Journal of Validation Technology*. Volume 17
- ¹²Mulyani, N, S., & Sarjono, P.R., (2007), Aktivitas Antibakteri Rimpang Temu Putih (*Curcuma manga Vall*), *Jurnal Sains dan Matematika (JSM)*, Universitas Diponegoro. Vol 15. No. 2
- ¹³Nurjannah, Izzati, L., Abdullah, A., (2011). Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kerang Pisau (*Solen spp.*). *Ilmu Kesehatan*. Vol 16 (3). 119-124
- ¹⁴Lumbanraja, L.B., (2009), Skrining Fitokimia dan Uji Efek antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) terhadap Radang pada Tikus, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Sumatra Utara, Medan.
- ¹⁵Hanani, E., Mun'im, A. & Sekarini, R. (2005). Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp.* Dari kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. ISSN : 1693-9883. Vol. II. No. 3: 127. (Online). (30 April 2016)
- ¹⁶Ariyanto, A. Uji Aktivitas Antioksidan, Penentuan Kandungan Fenolik dan Flavonoid Total Fraksi Kloroform dan Fraksi Air Ekstrak Metanolik Pegagan (*Centella asistica L. Urban*). *Skripsi*, Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada, 2006.
- ¹⁷Burda dan Oleszek W. 2001. *Antioxidant and antiradical activities of flavonoid*. *J agric food chem* 49 (6):2774-2779.
- ¹⁸Hudzicki, J. (2013). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. Diakses pada tanggal 15 Mei 2015. www.microbelibrary.org
- ¹⁹Vassileva, V., G. Milanov, G. Ignatov, and B. Nikolov. (1997). Effect of low pH on nitrogen fixation of common bean grown at various calcium and nitrate levels. *J. Plant Nutr.*, 20:279-294
- ²⁰Franklin, T.J dan Snow, G.W., (1985). *Biochemistry of*

- Antimicrobial Action. 3rd Ed. London, New York. Pp. 44-46, 127- 189, 172-200
- ²¹Kadlec K, Schwarz S.(2000) Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimikrob Agents Chemother. Feb*;53(2):776-8
- ²²Yulika, H. (2009). Pola Resistensi, *Skripsi*, Jakarta : Universitas Indonesia
- ²³Davis, W. W. dan Stout, T. R. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Applied Microbiology*. 22 (4): 659-665
- ²⁴Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12, 4, 564-582.
- ²⁵Naim,R. (2005). *Senyawa Antioksidan dari Tanaman*. *Harian Kompas Edisi Rabu*, 15 September 2004. (Online). (<http://kompas.com/kompas-cetak/contactus.htm>). diakses tanggal 11 Februari 2015