

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian. Identifikasi tanaman dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada bagian Biologi Farmasi. Hasil identifikasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan adalah benar biji labu kuning (*Cucurbita moschata Duch Poir*). Hasil identifikasi biji *C. moschata* dapat dilihat pada lampiran 1.

B. Penyiapan Sampel

Bahan baku simplisia yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari daerah Salatiga. Biji *C. moschata* yang dipilih dalam keadaan baik dan tidak cacat. Pada proses pembuatan simplisia, dilakukan proses sortasi basah dengan tujuan meminimalkan dan memisahkan bahan uji dari kotoran yang menempel. Biji *C. moschata* dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60°C. Tujuan dari pengeringan ini adalah untuk menghentikan proses enzimatik yang mungkin masih bisa terjadi sehingga dapat mengurangi degradasi zat aktif. Selain itu proses pengeringan juga berguna untuk mengurangi kandungan air dari simplisia, sehingga tidak dapat ditumbuhi jamur. Keberadaan air dalam jumlah yang tinggi akan mempengaruhi polaritas pelarut. (Suhendi *et al.*, 2007)

Sebanyak 1,75 kg biji *C. moschata* yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan ditumbuk dan *diblender* untuk mendapatkan partikel yang jauh

lebih kecil sehingga pelarut lebih mudah kontak dengan bahan dan berdifusi lebih banyak ke dalam partikel sehingga proses ekstraksi berlangsung lebih baik. Partikel sampel yang halus akan memperluas daya pelarutan sehingga pelarutan komponen pada sampel dapat lebih merata (Suhendi *et al.*, 2007). Serbuk biji *C. moschata* yang dihasilkan sebanyak 1,5 kg yang kemudian akan diekstraksi menggunakan metode maserasi.

C. Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi adalah proses pemisahan komponen-komponen terlarut dari komponen yang tidak larut dari suatu campuran dengan pelarut yang sesuai (Depkes, 2000). Ekstraksi biji *C. moschata* dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan. Maserasi dilakukan selama 5 hari dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan selanjutnya (Depkes, 2000). Menurut Farmakope edisi 4, perendaman yang baik berkisar antara 4-10 hari. Pemilihan metode maserasi berdasarkan pertimbangan kesederhanaan prosedur dan peralatan yang digunakan. Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan, sehingga pengaruh negatif akibat pemanasan terhadap senyawa termolabil yang mungkin terdapat dalam biji *C. moschata* dapat dihindari (Patel, 2013).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%. Etanol digunakan sebagai pelarut penyari karena etanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga mampu melarutkan senyawa yang memiliki kepolaran rendah

hingga relatif tinggi (Wulandari, 2011). Ekstraksi dengan pelarut etanol diharapkan dapat menyari lebih banyak komponen senyawa yang terdapat pada biji *C. moschata*. Hasil dari maserasi kemudian difraksinasi menggunakan metode partisi cair-cair dengan kloroform menggunakan corong pisah sehingga didapatkan fraksi kloroform *C. moschata*.

Proses fraksinasi menggunakan pelarut kloroform dan campuran etanol. Hal ini dilakukan karena dasar dari pemisahan dengan cara partisi cair-cair adalah perbedaan kelarutan dan syarat untuk melakukan partisi adalah dua pelarut yang digunakan tidak saling bercampur. Proses partisi bertujuan untuk menyari senyawa-senyawa yang terlarut dalam kloroform (Seidel, 2006). Pada saat dipartisi dengan pelarut kloroform terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas etanol dan lapisan bawah adalah kloroform. Hal ini karena massa jenis etanol (0,7883 g/ml) lebih kecil dibandingkan dengan kloroform (1,4474 g/ml).

Filtrat hasil fraksinasi dengan kloroform diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan kecepatan putaran 90 rpm. Penguapan ini bertujuan untuk memisahkan pelarut dari senyawanya. Untuk mendapat ekstrak kental dilakukan penguapan kembali menggunakan penangas air, hal ini bertujuan untuk menjaga agar suhu tetap di bawah titik didih air.

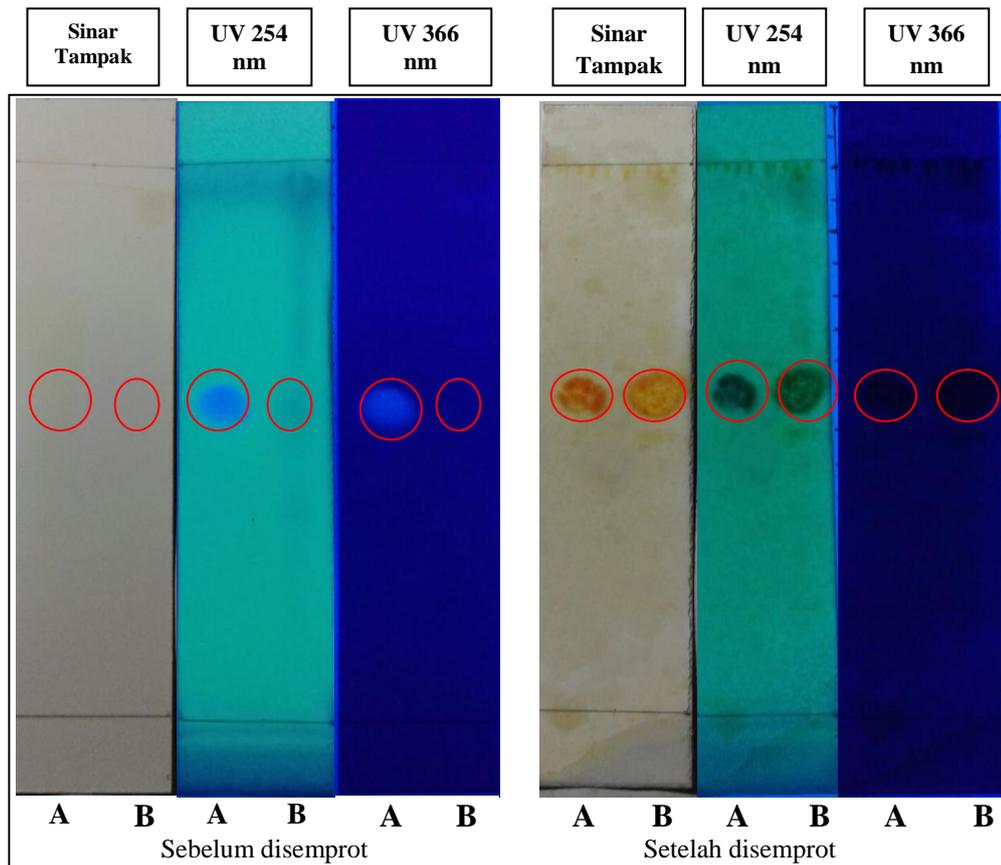
Dari 500 gram serbuk biji *C. moschata* yang difraksinasi dihasilkan sebanyak 4,6 gram ekstrak kental fraksi kloroform biji *C. moschata*. Fraksinasi biji *C. moschata* dengan pelarut kloroform menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat tua dengan rendemen yang diperoleh adalah 0,92%. Faktor yang

mempengaruhi jumlah rendemen yang dihasilkan adalah suhu ekstraksi, konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi (Maharani, *et al.*, 2009)

D. Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa yang diidentifikasi pada penelitian ini adalah flavonoid dan alkaloid. Untuk mengetahui adanya kandungan kedua senyawa tersebut maka dilakukan identifikasi senyawa secara kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji KLT umumnya digunakan untuk mengetahui kemurnian kandungan senyawa (Harborne, 1987) dan dapat digunakan untuk tujuan identifikasi senyawa (Farmakope Herbal Indonesia, 2009). Identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan jenis pereaksi semprot (Abdul Rohman, 2007). Hasil uji KLT dapat dilihat pada Tabel 3.

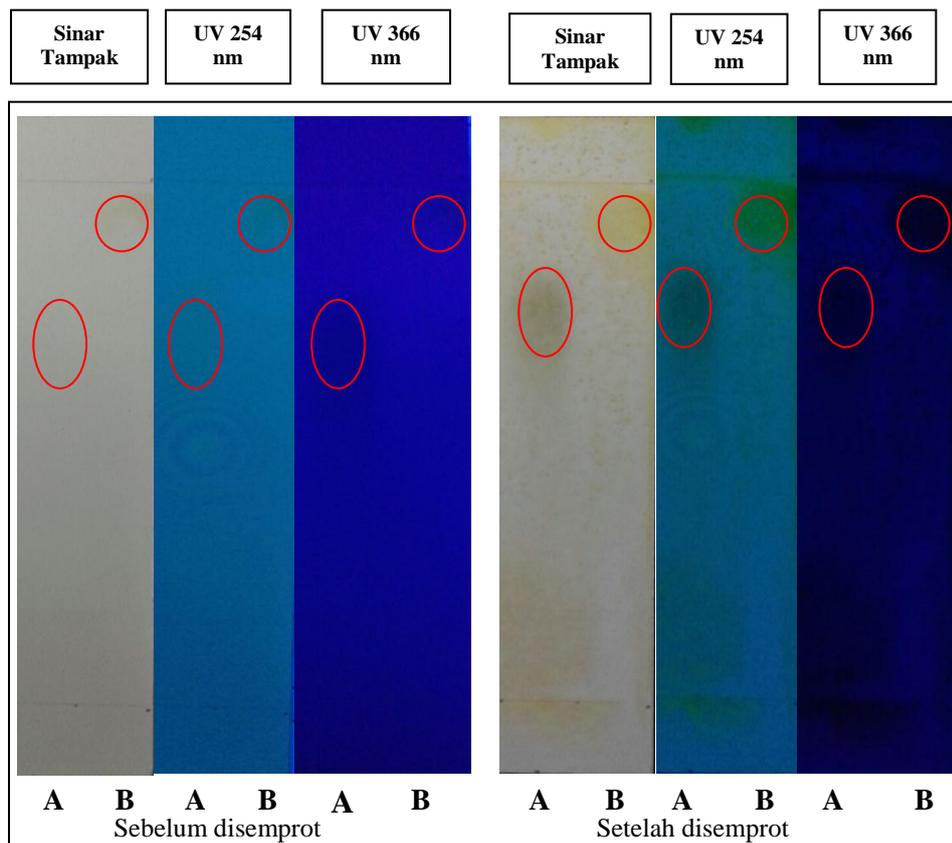
Pelarut pengembang yang digunakan pada KLT alkaloid adalah butanol : asam asetat : air (4:1:5). Setelah disemprot dengan pereaksi dragendorff senyawa alkaloid akan menunjukkan bercak berwarna oranye (Nurjannah *et al.*, 2011). Berdasarkan pengamatan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm dapat diketahui bahwa fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* menunjukkan bercak berwarna biru samar. Sedangkan pembanding kuinin menunjukkan bercak berwarna biru. Setelah disemprot menggunakan pereaksi dragendorff, kedua senyawa menunjukkan bercak berwarna oranye dengan nilai Rf 0,56. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi kloroform ekstrak etanolik biji labu kuning mengandung senyawa alkaloid. Profil kromatogram uji alkaloid dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Profil kromatogram senyawa alkaloid.

Keterangan : Kuinin sebagai pembanding senyawa alkaloid (A), fraksi kloroform biji *C. moschata* (B)

Pelarut pengembang yang digunakan pada uji KLT flavonoid adalah butanol : asam asetat : air (4:1:5). Menurut Marlina *et al.* (2005), profil kromatogram identifikasi golongan senyawa flavonoid menunjukkan bercak berwarna biru ketika dibaca pada panjang gelombang 366 nm dan berwarna biru hitam atau hijau kuning setelah disemprot dengan pereaksi FeCl_3 (Lumbanraja, 2009). Profil kromatogram uji KLT flavonoid dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Profil kromatogram senyawa flavonoid

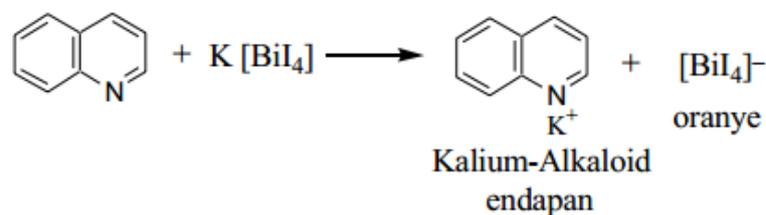
Keterangan : Rutin sebagai pembanding senyawa flavonoid (A), fraksi kloroform biji *C. moschata* (B)

Setelah disemprot dengan FeCl_3 , timbul noda dengan R_f 0,93 yang berwarna kuning pada pengamatan dengan sinar tampak, berwarna kuning hijau pada UV 254 nm dan berwarna biru hitam pada UV 366 nm. Pada senyawa rutin, setelah disemprot dengan pereaksi FeCl_3 timbul bercak berwarna hijau kehitaman dengan R_f 0,75 pada sinar tampak dan UV 254 nm. Pada UV 366 nm timbul warna biru kehitaman. Hal ini menegaskan adanya kandungan flavonoid pada fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata*. Hasil uji KLT fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT) fraksi kloroform ekstrak etanolik biji labu kuning

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

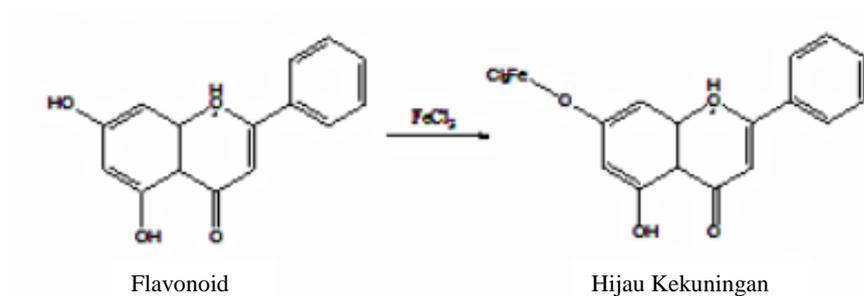
Uji alkaloid menggunakan pereaksi dragendorff. Hasil yang diperoleh pada pereaksi dragendorff untuk sampel fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* menunjukkan warna oranye yang menandakan terdapat senyawa alkaloid dalam sampel fraksi. Hal ini dikarenakan terjadi pengikatan ion K^+ pada nitrogen dalam cincin sehingga membentuk endapan berwarna oranye (Marliana, 2005). Reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi dragendorff dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Reaksi alkaloid dengan pereaksi dragendorff (Marliana, 2005)

Uji flavonoid menggunakan pereaksi $FeCl_3$. Hasil yang diperoleh pada fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* untuk pereaksi $FeCl_3$ yaitu endapan berwarna hijau kekuningan atau endapan berwarna hitam yang

menandakan bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid (Lestari, 2013). Reaksi senyawa flavonoid dengan FeCl_3 dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi flavonoid dengan pereaksi FeCl_3 (Lumbanraja, 2009)

E. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

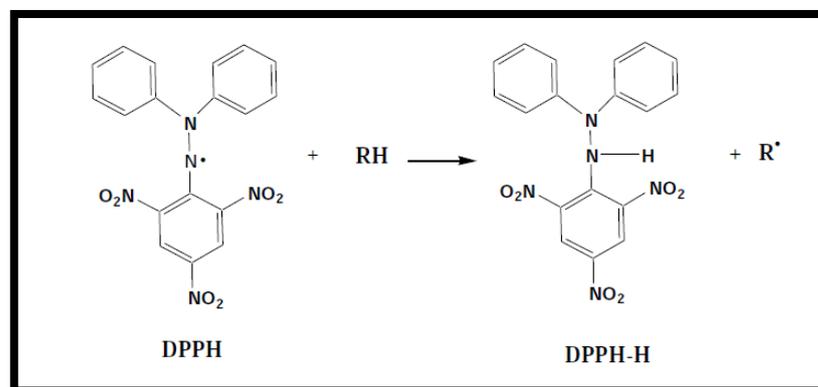
Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mendapatkan absorbansi yang optimal. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mendapatkan serapan yang maksimum dengan mengukur absorbansi senyawa DPPH pada daerah *visibel* (Budiarti *et al.*, 2014). Pada penelitian ini diperoleh panjang gelombang maksimalnya adalah 515 nm. Pengukuran serapan dilakukan setelah inkubasi selama 30 menit agar terjadi reaksi yang optimal antara DPPH sebagai radikal bebas dengan sampel yang diuji. Profil hasil penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Lampiran 2.

F. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode DPPH. Metode DPPH dipilih karena memerlukan sedikit sampel, sederhana, mudah, cepat, dan peka untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam (Hanani *et al.*, 2005). Pada metode ini, DPPH bertindak sebagai model radikal bebas yang akan berikatan dengan senyawa antioksidan (Simanjuntak *et*

al., 2004). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) 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 (Green, 2004; Gurav *et al.*, 2007).

Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh senyawa antioksidan adalah melalui donasi atom hidrogen sehingga menyebabkan perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Hanani *et al.*, 2005). Perubahan warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,2-difenil-2-pikrilhidrazin) (Desmiaty, R. 2008 ; Purwaningsih, 2012). Reaksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 9.



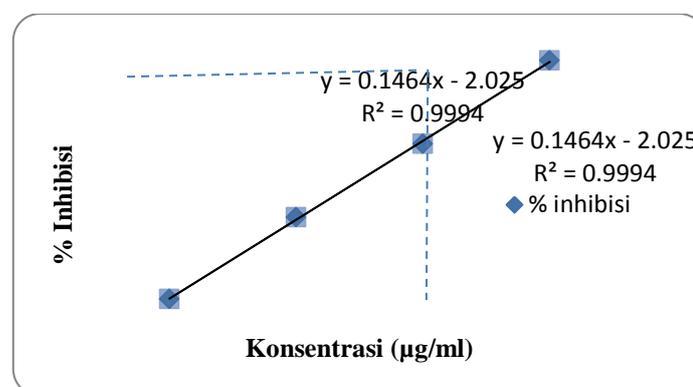
Gambar 9. Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas (Sumber: Prakash *et al.*, 2001)

Uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui absorbansi

DPPH setelah ditambahkan fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata*. Jika terjadi penurunan absorbansi DPPH, maka suatu senyawa memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Penurunan absorbansi DPPH diukur terhadap absorbansi kontrol yaitu absorbansi DPPH dalam metanol tanpa penambahan bahan uji (Molyneux, 2004). Penurunan absorbansi ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning. Degradasi warna larutan berbanding lurus dengan penambahan konsentrasi ekstrak (Prakash *et al*, 2001). Dari nilai absorbansi DPPH yang diperoleh dapat ditentukan persentase penghambatan radikal DPPH (% inhibisi). Dari nilai % inhibisi dapat ditentukan nilai IC_{50} (Molyneux, 2004). Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform biji *C. moschata* dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 10.

Tabel 4. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan fraksi kloroform biji *C. moschata*

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi	% Inhibisi
100	$0,426 \pm 0,023$	$12,40 \pm 4,76$
200	$0,353 \pm 0,010$	$27,60 \pm 2,25$
300	$0,287 \pm 0,013$	$41,13 \pm 2,72$
400	$0,211 \pm 0,008$	$57,37 \pm 0,58$



Gambar 10. Kurva regresi linier aktivitas antioksidan biji *C. moschata*

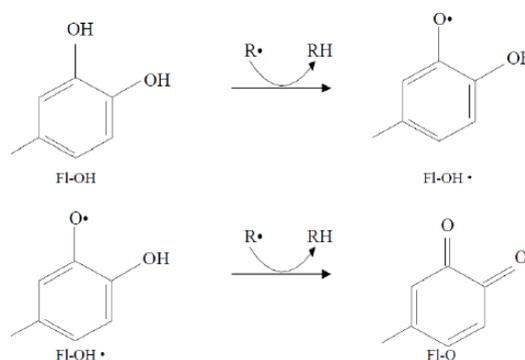
Kurva regresi linier aktivitas antioksidan fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* di atas menunjukkan dengan bertambahnya konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moschata* maka aktivitas antioksidan juga semakin meningkat. Perhitungan persentase inhibisi bisa dilihat pada lampiran 4. Persamaan yang diperoleh dari kurva regresi linier dapat digunakan untuk menghitung IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat 50% oksidasi.

Dari persamaan $y = 0.146x - 2.025$ dengan $R^2 = 0.999$ diperoleh Nilai IC_{50} fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* adalah $356.33 \mu\text{g/ml}$. 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 $IC_{50} = 356.33 \mu\text{g/ml}$ ($>150 \mu\text{g/ml}$). Penelitian yang dilakukan Rustina (2016), menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat biji *C. moschata* memiliki tingkat kekuatan antioksidan lemah yaitu dengan IC_{50} sebesar $453,35 \mu\text{g/ml}$. Sedangkan ekstrak etanolik biji *C. moschata* memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong lemah juga dengan IC_{50} sebesar $420,08 \mu\text{g/ml}$ (Rahmawati, 2016). Dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati dan Rustina (2016), ekstrak etanolik fraksi kloroform biji *C. moschata* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat daripada ekstrak etanolik biji *C. moschata* dan ekstrak etil asetat biji *C. moschata*.

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa yang didapat, golongan senyawa yang diduga berpotensi sebagai antioksidan di dalam fraksi kloroform biji *C. moschata* diantaranya adalah flavonoid dan alkaloid. Senyawa flavonoid pada

strukturnya mengandung gugus hidroksil yang dapat mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas, sehingga senyawa tersebut berpotensi sebagai antioksidan (Zuhra *et al.*, 2008)

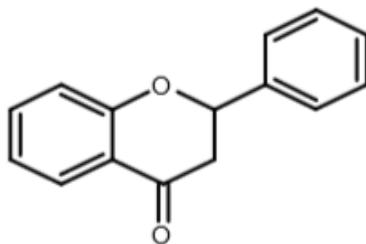
Flavonoid merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan karena senyawa tersebut adalah senyawa fenol yaitu senyawa dengan suatu gugus $-OH$ yang terikat pada karbon cincin aromatik. Produk radikal bebas senyawa ini terstabilkan secara resonansi dan tidak reaktif bila dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain sehingga dapat berfungsi sebagai antioksidan (Fessenden and Fessenden, 1986). Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid mempunyai kemampuan sebagai antioksidan karena mampu mentransfer sebuah elektron kepada senyawa radikal bebas, dimana $R\cdot$ merupakan senyawa radikal bebas. FI-OH merupakan senyawa flavonoid sedangkan FI-OH \cdot merupakan radikal flavonoid (Kandaswani dan Midelton, 1997). Reaksi peredaman radikal bebas oleh senyawa flavonoid seperti pada Gambar 11.



Gambar 11. Mekanisme peredaman radikal oleh flavonoid (Kandaswani dan Midelton, 1997)

Aktivitas antioksidan pada fraksi kloroform biji *C. moschata* tergolong lemah (Ariyanto, 2006). 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.

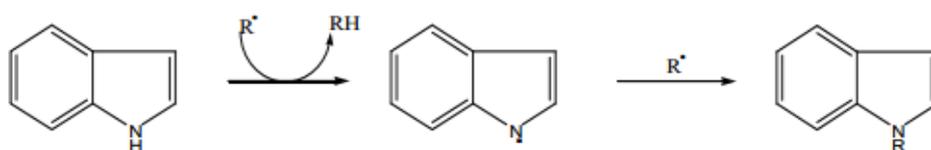
Faktor kedua yang menyebabkan lemahnya aktivitas antioksidan fraksi kloroform biji labu kuning yaitu diduga senyawa yang terkandung di dalam fraksi kloroform kemungkinan adalah flavonoid golongan flavanon. Senyawa flavanon menurut Burda dan Oleszek (2001), pada umumnya memiliki aktivitas antioksidan 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. Dengan demikian senyawa golongan flavanon pada umumnya memiliki potensi aktivitas antioksidan yang lemah. Pada Gambar 12 berikut merupakan struktur senyawa flavanon.



Gambar 12. Struktur senyawa flavanon (Saxena *et al.*, 1970).

Tidak semua senyawa golongan flavanon memiliki aktivitas antioksidan yang lemah. Senyawa flavanon yang memiliki aktivitas antioksidan kuat diantaranya adalah naringenin, hesperitin. Naringenin dan hesperitin memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dimana IC_{50} dari senyawa naringenin adalah 2,73 $\mu\text{g/ml}$, dan hesperitin adalah 3,13 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas antioksidan yang sangat kuat ini karena pada strukturnya senyawa naringenin dan hesperitin memiliki banyak gugus hidroksil yang banyak pada struktur senyawanya (Dimajo *et al.*, 2005).

Menurut Yuhernita dan Juniarti (2011), senyawa alkaloid memiliki kemampuan untuk menghentikan reaksi rantai radikal bebas secara efisien. Mekanisme reaksi penangkapan radikal DPPH oleh senyawa alkaloid ditunjukkan pada gambar 13.



Gambar 13. Mekanisme reaksi penangkapan radikal DPPH oleh senyawa alkaloid (Yuhernita dan Juniarti, 2011).

Senyawa alkaloid terutama indol, memiliki kemampuan untuk menghentikan reaksi rantai radikal bebas secara efisien. Beberapa senyawa

alkaloid yang bersifat antioksidan adalah quinolon, kafein yang dapat bertindak sebagai peredam radikal hidroksil dan melatonin yang berperan penting menjaga sel dari pengaruh radiasi dan toksisitas obat-obatan (Yuhernita dan Juniarti, 2011). Namun dalam penelitian ini belum dapat diketahui jenis alkaloid apa yang berperan dalam bioaktivitas antioksidan.

G. Uji Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi cakram/Kirby-Bauer. 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 (Hudzicki, 2013). Media pertumbuhan bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Trypticase Soy Agar* (TSA). TSA merupakan media kultur universal, hampir semua jenis bakteri bisa tumbuh pada media ini baik bakteri gram positif maupun gram negatif. Pemilihan bakteri *S. aureus* pada penelitian ini karena bakteri *S. aureus* merupakan bakteri yang banyak menyebabkan infeksi pada manusia.

Fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* yang didapatkan dari ekstraksi sebelumnya kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dengan kertas cakram untuk mengetahui apakah fraksi kloroform *C. moschata* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Ekstrak kental yang didapat dibuat dengan seri konsentrasi yaitu 5% , 10% , 25% dan 50%. Seri konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moschata* tersebut

dilakukan pengujian dengan tiga kali replikasi. Data yang diperoleh digunakan sebagai parameter untuk melihat kemampuan fraksi kloroform biji labu kuning menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

Nilai diameter hambat didasarkan pada luas zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang diukur menggunakan penggaris. Semakin luas zona bening yang terbentuk maka semakin baik keefektifan daya antibakteri dari sampel yang diujikan. Pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini juga dilakukan pada tetrasiklin sebagai kontrol positif. Pemilihan tetrasiklin sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena antibiotik tetrasiklin 0,2 mg/ml memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ampisilin dan amoksisilin (Mulyani dan Sarjono, 2007). Menurut Velhner dan Milanov (2015), tetrasiklin mempunyai kemampuan menghambat sintesis protein bakteri *S. aureus* dengan mencegah t-RNA aminoasil berikatan dengan ribosom.

Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan DMSO bertujuan untuk memastikan bahwa aktivitas antibakteri pada saat penelitian berasal dari sampel uji. Pemilihan DMSO sebagai kontrol negatif karena DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar. Selain itu DMSO tidak memberikan daya hambat pertumbuhan bakteri sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (Handayani, *et al.*, 2005). Parameter aktivitas antibakteri berdasarkan zona inhibisi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Hasil pengukuran zona inhibisi pada sampel fraksi kloroform biji *C. moschata* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. 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 5 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.

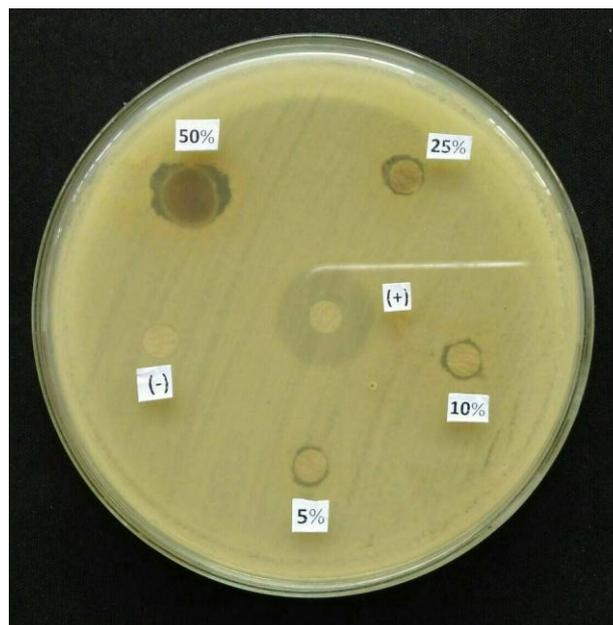
Pada kontrol positif tetrasiklin tidak dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 secara sempurna. Terbentuknya diameter disekitar *paper disc* akan tetapi masih terdapat bakteri yang tumbuh menunjukkan bahwa beberapa *Staphylococcus aureus* telah mengalami resistensi terhadap antibiotik tetrasiklin. Penelitian yang dilakukan oleh Khusnan *et al.*, (2016), mengungkapkan bahwa *Staphylococcus aureus* resisten terhadap penisilin 78% (18/23), doksisisiklin 56% (15/23), gentamisin 26% (6/23), tetrasiklin 22% (5/23), eritromisin 13% (3/23), dan metisilin 9% (2/23). Dowson *et al.*, (2000),

melakukan isolasi terhadap beberapa tipe genetik *Staphylococcus aureus*. Tiga dari genetik tersebut menunjukkan bahwa terjadi resistensi terhadap tetrasiklin.

Franklin dan Snow (1985) serta Brander *et al.*, (1991) mengatakan bahwa mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik terjadi dengan cara pengaktifan obat, perubahan target atau sirkulasi enzim, berkurangnya akumulasi obat oleh adanya sel resisten, variasi jalur metabolisme. Resistensi terhadap banyak obat seperti tetrasiklin, kloramfenikol, fluorokuinolon, makrolida, dan beta laktam, dimediasi oleh mekanisme pompa efluks yang dapat memindahkan obat ke luar sel (Prasetyo, 2009). Jika suatu antibakteri telah berhasil melewati membrane sel, obat tersebut dapat dieliminasi oleh bakteri dengan mekanisme pompa efluks yang aktif. Ini merupakan contoh dari resistensi tetrasiklin. 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 (Yulika, 2009). Resistensi *Staphylococcus 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. (Kadlec dan Schwarz, 2009)

Sedangkan pada kontrol negatif DMSO tidak menunjukkan adanya zona bening. 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 (Davis dan Stout, 1971). Dari hasil pengujian ini dapat disimpulkan bahwa keempat konsentrasi fraksi kloroform biji *C. moschata* 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 14.



Gambar 14. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi kloroform biji *C. moschata* terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC 0047
Keterangan : Tetrasiklin (+) , DMSO (-)

Biji *C. moschata* mengandung komponen zat aktif yaitu flavonoid dan alkaloid. Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol yang dapat bekerja sebagai antiseptik dan desinfektan dengan cara denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri (Pelczar dan Chan, 1988). 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 (Cowan, 1999). 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 (Naim, 2005).

Pada penelitian yang dilakukan, keempat seri konsentrasi fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang tergolong lemah. Hal yang sama juga diungkapkan oleh Rustina (2016), ekstrak etil asetat biji *C. moschata* memiliki aktivitas antioksidan yang lemah dengan nilai DZI sebesar 12,6 mm pada konsentrasi 20%. Dibandingkan dengan fraksi kloroform ekstrak etanolik biji *C. moschata*, ekstrak etil asetat biji *C. moschata* memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat, walaupun keduanya sama-sama tergolong memiliki aktivitas antibakteri yang lemah (Davis dan Stout, 1971). 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 (Harborne, 1987).