

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian laboratorium ini adalah untuk menguji sifat antibakteri dari ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%.

3.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan mencakup pisau, talenan, blender, watterbath, rotary evaporator, tabung reaksi, rak tabung, cawan petri, inkubator, autoklaf, cawan porselen, pipet volumetrik atau micropipet, hot plate, gelas ukur, ose steril, alat pengukur suhu, kertas saring, labu erlenmeyer, kapas lidi steril, cork borer, gelas ukur, laf, vortex, magnetic stirrer, colony counter, dan neraca analitik.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah kulit semangka (*Citrullus lanatus*), etanol 70%, aquadest steril, DMSO 10%, NaCl, media MHA, larutan McFarland 0,5, kultur *S.aureus* dan *E.coli*, kloramfenikol 1 mg/ml sebagai kontrol positif, reagen Mayer, Dragendorff, HCl, FeCl₃, dan HCl 2N. (Pratiwi, 2018).

3.3 Variabel

2.3.1 Variabel Bebas

Konsentrasi yang digunakan untuk kedua bakteri tersebut yaitu ekstrak kulit semangka 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%.

2.3.2 Variabel Terkait

Variabel terkait meliputi mikroorganisme uji yaitu *S. aureus* dan *E. coli*, jenis media Mueller Hinton Agar (MHA), kloramfenikol 0,3% sebagai kontrol positif, dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif.

2.3.3 Variabel Kontrol

Zona hambat pertumbuhan bakteri (dalam milimeter) terhadap ekstrak kulit semangka yang menunjukkan efektivitas antibakteri.

2.3.4 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Satuan Pengukuran	Metode Pengukuran
Variabel Bebas: Konsentrasi ekstrak kulit semangka (<i>Citrullus lanatus</i>)	Ekstrak etanol 70% dari kulit semangka pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%	% (b/v)	Melarutkan 2 gram ekstrak kental 2 ml dalam DMSO 10%, dilanjutkan dengan pengenceran serial
Variabel Terkendali: Jenis Bakteri Uji	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i> sebagai mikroorganisme target dalam uji antibakteri	-	Diperoleh dari isolat murni dan disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 ($\pm 1,5 \times 10^8$ CFU/mL)
Media Agar (Mueller Hinton Agar)	Media padat untuk menumbuhkan bakteri selama pengujian antibakteri	-	Disiapkan sesuai protokol, dituangkan ke cawan petri steril, dan didiamkan hingga memadat
Kontrol Positif (Kloramfenikol 0,3%)	Larutan antibiotik kloramfenikol 0,3% digunakan untuk pembanding aktivitas antibakteri	%	Melarutkan 1 gram kloramfenikol dalam 10 mL akuades steril

Kontrol Negatif (DMSO 10%)	Larutan pelarut DMSO 10% tanpa kandungan ekstrak sebagai kontrol untuk menunjukkan bahwa pelarut tidak memiliki aktivitas antibakteri	%	DMSO 10% digunakan langsung tanpa penambahan ekstrak
Variabel Terikat: Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri	Luas zona bening (hambat) di sekitar sumur yang menunjukkan kemampuan antibakteri dari ekstrak	Mm	Diukur menggunakan jangka sorong dari dua sisi (DV dan DH), kemudian dirata- ratakan

3.4 Pengumpulan Sampel Dari Pedagang Buah

Kulit semangka yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini diperoleh secara purposive dari buah semangka segar yang dibeli di Pasar Baru, Karawang, Jawa Barat. Pemilihan sampel dilakukan dengan mempertimbangkan kondisi buah, yaitu dalam keadaan segar, tidak rusak, bebas dari busuk, dan memiliki kulit yang utuh. Pengambilan sampel secara langsung dilakukan untuk memastikan kualitas bahan tetap terjaga sejak awal hingga tahap ekstraksi.

3.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Derteminasi

Herbarium Jatinangor, Laboratorium Biosistemika dan Molekuler, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Bandung, menjadi tempat penentuan identitas tanaman. Seluruh bagian tanaman yang ditemukan ditemukan pada buah semangka yang masih segar. Berdasarkan hasil identifikasi, tanaman tersebut dikategorikan sebagai *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & *Citrullus lanatus* (Thunb.). Nakai termasuk dalam famili *Cucurbitaceae*.

2.5.2 Preparasi sampel

Setelah memisahkan kulit buah semangka merah dari daging buahnya, bersihkan secara menyeluruh dengan air mengalir. Setelah kulit buah ditiriskan, potong-potong menjadi beberapa bagian dengan panjang sekitar 2 cm dan lebar 2 cm. Ketebalannya 1 sentimeter. Potongan-potongan kulit tersebut dibiarkan mengering di bawah sinar matahari. Di bawah sinar matahari, dilindungi oleh kain hitam agar kulit tidak mengering dan terkontaminasi. Untuk membuat simplisia kulit semangka merah (*Citrullus lanatus*), kulitnya dikeringkan lalu digiling menjadi serbuk dengan menggunakan blender (Susanti *et al.*, 2021).

2.5.3 Pembuatan Ekstrak Kulit Semangka

Sebanyak 500 gram serbuk kulit semangka kering diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10, yaitu sebanyak 5 liter. Campuran tersebut dimaserasi selama tiga hari dalam toples kaca besar yang ditutup aluminium foil dan dibungkus plastik hitam untuk menghindari paparan cahaya, serta disimpan di tempat sejuk dan kering. Selama proses maserasi, campuran diaduk setiap 6 jam sekali. Setelah itu, maserat disaring dan filtrat dikumpulkan, sedangkan ampas disari kembali menggunakan tambahan 2 liter etanol 70% sebanyak dua kali. Filtrat hasil penyarian digabungkan lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu rendah sekitar 40–50 °C, dan pelarut yang tersisa diuapkan di atas water bath hingga diperoleh ekstrak kental kulit semangka (Novelni *et al.*, 2019).

2.5.4 Skrining Fitokimia

Ekstrak diuji untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dengan metode berikut:

1. Alkaloid

Setelah melarutkan 0,5 gram ekstrak kulit semangka dalam HCl, campuran tersebut dibagi menjadi dua tabung reaksi. Ketika dua hingga tiga tetes pereaksi Dragendorff diteteskan ke dalam tabung pertama, endapan oranye terbentuk, menandakan adanya alkaloid. Ketika pereaksi Mayer diaplikasikan pada tabung kedua, endapan putih atau kuning terbentuk, menandakan uji alkaloid berhasil (Fadhila *et al.*, 2019).

2. Flavonoid

Ekstrak 0,5 gram kulit semangka dilarutkan dalam etanol 70% dan HCl pekat. Warna merah menandakan flavonoid, sedangkan oranye menunjukkan flavon (Syakri *et al.*, 2019).

3. Saponin

10 ml air panas dan 2 ml ekstrak kulit semangka digabungkan dalam tabung reaksi, didinginkan, dan dikocok dengan keras. Selama sepuluh menit. Keberadaan saponin diindikasikan jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm dan bertahan selama 10 menit (Rijayanti, 2015).

4. Tanin dan Fenol

Setelah melarutkan 0,5 gram ekstrak kulit semangka ke dalam air, dua hingga tiga tetes larutan FeCl_3 ditambahkan. Menurut Syakri *dkk* (2019), jika muncul warna biru atau hijau, maka ekstrak tersebut positif mengandung bahan kimia fenol.

3.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri

2.6.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan

Bersihkan peralatan hingga benar-benar bersih, lalu bungkus menggunakan kertas. Sterilisasi peralatan dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Putri *et al.*, 2019).

2.6.2 Pembuatan Media MHA

300 ml aquadest digunakan untuk melarutkan 11,4 gram bubuk MHA, yang kemudian dipanaskan hingga mendidih dan larut total. Setelah diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mensterilkan larutan, larutan dibiarkan dingin hingga mencapai suhu kamar. Media yang masih cair dimasukkan ke dalam cawan petri steril, masing-masing sebanyak 20 mL, didiamkan hingga mengeras, kemudian didinginkan hingga diperlukan. (Wijayanti & Safitri, 2018; Astriani *et al.*, 2021).

2.6.3 Peremajaan Bakteri

Ose steril digunakan untuk mengekstrak koloni murni *S. aureus* dan *E. coli*, yang kemudian diinokulasikan kembali ke dalam media Mueller Hinton Agar (MHA). Untuk menghasilkan koloni yang segar dan aktif, media dikultur selama 24 jam pada suhu 37°C (Putri *et al.*, 2019).

2.6.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Setelah dibiakkan menggunakan ose steril, satu koloni disuspensikan ke dalam media Mueller Hinton Agar (MHA) dan dibiakkan selama dua puluh empat jam pada suhu 37°C. Untuk menjamin jumlah bakteri yang konsisten dalam setiap pengujian, suspensi diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% setelah diinkubasi, dan kekeruhannya kemudian dikoreksi dengan standar McFarland 0,5 ($\pm 1,5 \times 10^8$ CFU / mL) (Noval *et al.*, 2019).

2.6.5 Pembuatan Kontrol Positif Dan Negatif

Untuk membuat larutan induk, 250 mg kapsul kloramfenikol dibuat, 1 g bubuk ditimbang, dan campuran tersebut dilarutkan dalam 10 ml aquadest steril dengan konsentrasi 100 mg/ml. Selain itu, untuk mencapai konsentrasi 100 mg/ml, sebanyak 1 ml larutan induk diencerkan dengan 10 ml aquades steril. Untuk membuat larutan akhir dengan konsentrasi 1 mg/ml, diambil 1 ml larutan dan ditambahkan 10 ml aquadest steril (Pratiwi, 2018).

2.6.6 Pembuatan Larutan Uji

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 2 gram ekstrak kental kulit semangka dalam 2 mL pelarut DMSO 10%, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 100% (b/v). Selanjutnya, dilakukan pengenceran secara bertingkat (serial dilution) menggunakan DMSO 10% untuk mendapatkan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Masing-masing larutan akhir memiliki volume total 2 mL. Kontrol negatif dibuat dengan menggunakan 2 mL DMSO 10% tanpa penambahan ekstrak.

2.6.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Dengan menggunakan media Mueller Hinton Agar (MHA), metode difusi sumuran digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri. Kapas dan lidi kapas steril digunakan untuk menginokulasi permukaan MHA secara merata dengan larutan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* yang telah dikalibrasi dengan standar McFarland 0,5 ($\pm 1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Pada media padat, dibuat sumuran berdiameter ± 6 mm, dan 50 μ L larutan uji yang mengandung konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125% ekstrak kulit semangka kemudian ditambahkan ke dalam setiap sumuran. DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan larutan kloramfenikol 250 mg digunakan sebagai kontrol positif. Zona hambat yang terbentuk setelah 24 jam inkubasi pada suhu 37°C diukur dalam satuan milimeter dengan menggunakan jangka sorong sebagai ukuran efektivitas antibakteri dari cawan petri (Fiana *et al.*, 2020).

Ukuran zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran pada media agar dikenal sebagai Diameter Daerah Hambat (DDH), dan berfungsi sebagai pengukur aktivitas antibakteri ekstrak. Dengan menggunakan metode difusi sumur, ekstrak kulit semangka dievaluasi dalam penelitian ini terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Sebanyak 50 μ L larutan uji yang mengandung kontrol negatif DMSO 10% dan kontrol positif kloramfenikol 0,3% ditambahkan ke dalam setiap sumuran. Zona hambat diukur dalam milimeter (mm), dan aktivitas antibakteri ekstrak meningkat dengan DDH.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) merupakan konsentrasi terendah ekstrak yang masih menunjukkan zona hambat. KHM menunjukkan batas efektivitas minimum suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Jika konsentrasi 3,125% masih membentuk zona hambat, maka nilai tersebut dianggap sebagai KHM. Penentuan KHM penting untuk mengetahui potensi antibakteri ekstrak secara efisien dan menentukan dosis terendah yang masih efektif.

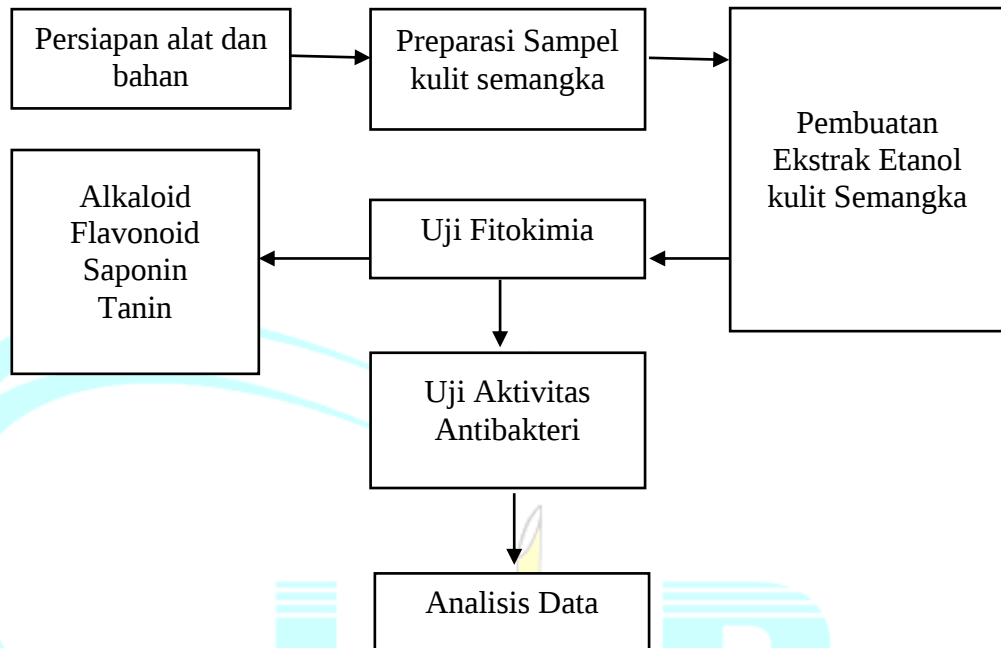
3.7 Analisis Data

Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 Mm. Setiap sampel diukur pada tiga titik berbeda, kemudian dihitung rata-rata untuk memperoleh hasil yang mewakili.

Penggunaan jangka sorong dipilih karena alat ini mampu memberikan hasil yang presisi dan sesuai untuk pengukuran diameter kecil seperti zona hambat (Amani & Arief, 2015).

Selain itu, uji ANOVA satu arah digunakan pada tingkat signifikansi 0,05 untuk menentukan apakah ada perbedaan yang signifikan di antara perlakuan. Jika ada, uji Tukey HSD digunakan untuk menentukan apakah ada perbedaan yang signifikan. Analisis deskriptif juga dilakukan untuk menentukan kategori penghambatan berdasarkan ukuran zona hambat.

3.8 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

KARAWANG