

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini dirancang sebagai penelitian eksperimental laboratorium dengan pendekatan kuantitatif dan bersifat komparatif, yang bertujuan untuk membandingkan aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat kulit semangka (*Citrullus lanatus*) terhadap *Propionibacterium acnes*. Rangkaian penelitian meliputi proses ekstraksi, fraksinasi dengan pelarut bertingkat, uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder, serta uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran (well diffusion) pada media Mueller Hinton Agar, dengan pengukuran diameter zona hambat sebagai parameter efektivitas.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juni hingga Agustus 2025. Seluruh kegiatan penelitian, yang meliputi proses ekstraksi kulit semangka, fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat, serta uji aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dengan metode difusi sumuran (well diffusion), dilakukan di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang yang beralamat di Jl. Raya Telukjambe No. 1, Sirnabaya, Telukjambe Timur, Kabupaten Karawang, Provinsi Jawa Barat 41361.

3.3 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, yellow tip, beaker glass, corong pisah, timbangan analitik, pipet tetes, kertas saring dan neraca analitik.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi kulit semangka merah (*Citrullus lanatus*), etanol 70%, aquadest, n-heksan, etil asetat, DMSO 10%, klindamisin (kontrol positif, konsentrasi 1%), NaCl 0,9%, media Mueller Hinton Agar (MHA), biakan *Propionibacterium acnes*, serta reagen uji fitokimia seperti HCl pekat, Dragendorff, Mayer, FeCl₃ 10%, kloroform, asam asetat anhidrat, dan H₂SO₄ pekat.

3.4 Variabel Penelitian

2.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jenis dan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Penelitian menggunakan ekstrak etanol kulit semangka (*Citrullus lanatus*) dengan berbagai konsentrasi, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Selain itu, digunakan juga dua jenis fraksi hasil pemisahan ekstrak etanol, yaitu fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat. Variasi konsentrasi dan jenis fraksi ini digunakan untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas biologis, khususnya aktivitas antibakteri yang diteliti.

2.3.2 Variabel Terkendali

Jenis bakteri uji: *Propionibacterium acnes*, Jenis media: Media agar, Kontrol positif: Klindamisin 1% Dan Kontrol negatif: DMSO 10%.

2.3.3 Variabel Terkait

Diameter zona hambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* (dalam mm).

2.3.4 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Satuan Pengukuran	Metode Pengukuran
Variabel Bebas Konsentrasi ekstrak etanol kulit semangka (<i>Citrullus lanatus</i>)	Uji aktivitas antibakteri terhadap <i>Propionibacterium acnes</i> dilakukan menggunakan ekstrak etanol kulit semangka pada variasi konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%.	mg/mL	1. Menimbang 2 gram ekstrak kulit semangka. 2. Melarutkan dalam 2 ml DMSO 10% hingga mencapai konsentrasi yang diinginkan
Pelarut Fraksi N-Heksan	Fraksi n-Heksan dari ekstrak etanol kulit semangka diuji aktivitas antibakterinya terhadap <i>Propionibacterium acnes</i> pada variasi konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%.	mg/mL	1. Menimbang 2 gram ekstrak kulit semangka. 2. Melarutkan dalam 2 ml DMSO 10% hingga mencapai konsentrasi yang diinginkan
Pelarut Etil-asetat	Fraksi etil-asetat ekstrak etanol kulit semangka yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri terhadap <i>Propionibacterium acnes</i> dengan variasi konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%.	mg/mL	1. Menimbang 2 gram ekstrak kering kulit semangka. 2. Melarutkan dalam 2 ml DMSO 10% hingga mencapai konsentrasi yang diinginkan
Variabel Terkendali 1. Jenis bakteri uji (<i>Propionibacterium acnes</i>).	Bakteri Gram-positif penyebab jerawat yang digunakan sebagai	-	1. Peremajaan bakteri di media agar mha. 2. Membuat suspensi bakteri sesuai standar

	mikroorganisme uji untuk menilai aktivitas antibakteri ekstrak kulit semangka.		kekeruhan McFarland (10^8 CFU/mL).
Variabel Terkendali 2. Jenis media (Media agar)	Media agar digunakan untuk menumbuhkan <i>P. acnes</i> sebagai bakteri uji dalam uji aktivitas antibakteri.	-	1. Menimbang dan melarutkan komposisi media agar sesuai petunjuk. 2. Mensterilkan media menggunakan autoklaf. 3. Menuangkan media ke dalam cawan petri untuk pengujian.
Variabel Terkendali 3. Kontrol positif (Klindamisin 1%)	Larutan antibiotik klindamisin 1% digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) untuk menilai efektivitas ekstrak kulit semangka dalam menghambat pertumbuhan bakteri.	%	1. Menimbang 1 g klindamisin. 2. Melarutkan dalam DMSO 10% hingga mencapai volume 100 mL, menghasilkan konsentrasi 1%.
Variabel Terkendali 4. Kontrol negatif (DMSO 10%)	Larutan DMSO 10% tanpa kandungan senyawa antibakteri, digunakan sebagai kontrol negatif untuk memastikan bahwa pelarut tidak memberikan efek antibakteri.	%	1. Menyiapkan DMSO 10%. 2. Digunakan sebagai pelarut ekstrak dan sebagai pembanding negative
Variabel Terkait Diameter zona hambat (Propionibacterium acnes)	Lebar zona hambat di sekitar sumuran (well) pada media agar yang menunjukkan kemampuan ekstrak menghambat pertumbuhan <i>Propionibacterium acnes</i>	Mm	1. Mengukur zona hambat secara vertikal (DV) dan horizontal (DH) menggunakan jangka sorong. 2. Menghitung diameter zona hambat dengan rumus: $\frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$, di mana DC = diameter sumur.

3.5 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel kulit semangka dilakukan dengan metode purposive sampling, yaitu teknik pengambilan sampel secara sengaja berdasarkan kriteria tertentu. Sampel diambil dari buah semangka segar yang dibeli di Pasar Baru, Karawang Jawa Barat, dengan kriteria buah dalam kondisi segar, tidak busuk, tidak cacat, dan memiliki kulit luar yang utuh. Pengambilan dilakukan secara langsung dari penjual buah untuk memastikan ketersediaan dan kualitas bahan baku yang digunakan dalam penelitian.

3.6 Prosedur Penelitian

2.6.1 Determinasi

Kulit semangka merah (*Citrullus lanatus*) diperoleh secara purposive sampling dari buah semangka segar yang dibeli langsung di Pasar Baru, Karawang Jawa Barat, dengan kriteria buah segar, tidak busuk, tidak cacat, dan kulit utuh. Untuk memastikan spesies tumbuhan yang digunakan, dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Taksonomi, Fakultas Biologi UNPAD.

2.6.2 Preparasi sampel

Kulit buah semangka merah dipisahkan dari dagingnya, kemudian dibersihkan menggunakan air mengalir hingga benar-benar bersih. Setelah itu, kulit ditiriskan dan dipotong dengan ukuran sekitar 2 cm panjang dan 1 cm tebal. Potongan kulit tersebut dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari, dilindungi dengan kain hitam untuk menghindari kontaminasi. Setelah kering, kulit dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, menghasilkan simplisia kulit semangka merah (*Citrullus lanatus*) (Susanti *et al.*, 2021).

2.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol

Sebanyak 500 gram serbuk kering kulit semangka diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10, yaitu 5 liter pelarut untuk 500 gram simplisia. Perendaman dilakukan dalam toples kaca besar yang ditutup dengan aluminium foil dan dibungkus plastik hitam untuk melindungi dari cahaya, kemudian disimpan di tempat sejuk dan kering selama tiga hari sambil diaduk secara berkala agar senyawa aktif dapat terekstraksi secara optimal. Setelah itu, campuran disaring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung dalam botol kaca. Ampas yang tersisa diekstraksi ulang dengan penambahan 2 liter etanol 70% dan diaduk kembali, diulang sebanyak dua kali. Filtrat dari kedua tahap ekstraksi digabungkan lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu rendah sekitar 40–50 °C untuk menghilangkan pelarut, kemudian dikentalkan lebih lanjut dengan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental kulit semangka. Metode ini dilakukan untuk memperoleh ekstrak dengan kandungan senyawa aktif yang tinggi dan hasil yang optimal (Mahatrinny *et al.*, 2015).

2.6.4 Fraksinasi Kulit Semangka

Sebanyak 20 gram ekstrak etanol 70% dicampurkan dengan 160 mL akuades hingga homogen. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 160 mL n-heksana. Setelah dikocok hingga tercampur rata, larutan dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan. Kedua lapisan tersebut kemudian dipisahkan, dengan fasa n-heksana dan fasa air ditampung dalam wadah terpisah. Fasa air dimasukkan kembali ke corong pisah, lalu ditambahkan 160 mL n-heksana dan diulangi proses yang sama sebanyak dua kali sampai fasa n-heksana menjadi jernih. Seluruh fasa n-heksana yang diperoleh digabungkan dan diuapkan hingga menghasilkan fraksi ekstrak kental. Proses

fraksinasi dilanjutkan dengan memasukkan kembali fasa air ke corong pisah, ditambahkan 160 mL etil asetat, lalu dikocok hingga homogen. Setelah terbentuk dua lapisan, keduanya dipisahkan dan ditampung dalam wadah berbeda. Proses ini dilakukan dua kali hingga diperoleh fasa etil asetat yang jernih. Baik fasa air maupun fasa etil asetat kemudian diuapkan hingga didapatkan ekstrak kental (Karim, 2022).

2.6.5 Uji Fitokimia

Khalisha, P. N., & Widyaningrum, I. (2022) menyatakan bahwa uji fitokimia digunakan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak dan fraksi kulit semangka melalui penambahan reagen sesuai dengan jenis metabolit yang diuji. Observasi dilakukan dengan memperhatikan perubahan seperti warna, endapan, atau busa sebagai indikasi keberadaan senyawa, yang dinyatakan positif (+), sedangkan jika tidak ada perubahan, hasilnya dinyatakan negatif (-).

1. Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak kulit semangka dicampur dengan etanol 70%, lalu ditetesi 5 sampai 6 tetes HCl pekat. Jika larutan berubah warna menjadi merah, itu menunjukkan adanya flavonoid, sedangkan warna oranye menunjukkan adanya flavon (salah satu jenis flavonoid) (Syakri *et al.*, 2019).

2. Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak kulit semangka dilarutkan dalam HCl dan dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Pada tabung pertama, ditambahkan 2–3 tetes pereaksi Dragendorff. Munculnya endapan berwarna jingga menandakan adanya senyawa alkaloid. Pada tabung kedua, ditambahkan 2–3 tetes pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih atau kuning, maka menunjukkan hasil positif adanya alkaloid (Fadhila *et al.*, 2019).

3. Saponin

Sebanyak 2 mL ekstrak kulit semangka sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas. Setelah didinginkan, campuran dikocok kuat selama 10 menit. Munculnya buih setinggi 1–10 cm yang tidak menghilang selama 10 menit menunjukkan adanya kandungan senyawa saponin dalam ekstrak tersebut (Rijayanti, 2015).

4. Terpenoid tannin steroid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak kulit semangka dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Setelah itu, secara perlahan tambahkan 1–2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Munculnya cincin merah atau ungu pada batas dua lapisan menandakan adanya terpenoid, sedangkan cincin berwarna hijau kebiruan menunjukkan keberadaan steroid (Endrani, 2016).

5. Fenol atau tanin

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak kulit semangka ditambahkan larutan FeCl_3 10% ke dalam sampel uji. Kehadiran senyawa fenol ditandai dengan munculnya warna hitam kehijauan, sedangkan warna cokelat kehijauan menunjukkan adanya senyawa tanin dalam sampel (Afriani *et al.*, 2016).

2.7 Pengujian Aktivitas Antibakteri

2.7.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan

Sebelum digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri, seluruh peralatan harus melalui proses sterilisasi. Alat gelas disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pinset dan jarum ose disterilisasi dengan cara dibakar langsung di atas api.

Sementara itu, media juga diproses dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Alusinsing, 2017).

2.7.2 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Dalam penelitian ini, kontrol positif yang digunakan adalah klindamisin dengan konsentrasi 1%. Untuk membuat kontrol positif tersebut, sebanyak 1 gram gel klindamisin dilarutkan dalam larutan DMSO 10% hingga volume mencapai 10 ml. Sementara itu, kontrol negatif menggunakan larutan DMSO 10% sesuai dengan metode yang dijelaskan (Madani, 2021).

2.7.3 Pembuatan Media Mueller Hinton Agar

Media MHA seberat 5 gram ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 130 mL aquadest dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer bersama dengan batang pengaduk magnetik (stir bar). Larutan dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih dan media larut sempurna hingga larutan tampak bening. Setelah itu, labu Erlenmeyer berisi larutan media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan kemudian dituangkan ke dalam 6 hingga 7 cawan petri, masing-masing sebanyak $\pm 18-22$ mL, dan didiamkan hingga mencapai suhu sekitar 50°C. Selanjutnya, cawan petri yang telah berisi media dibungkus menggunakan plastik wrap dan disimpan dalam lemari pendingin (Wijayanti & Safitri, 2018).

2.7.4 Peremajaan Bakteri

Peremajaan *Propionibacterium acnes* dilakukan terlebih dahulu untuk memperbarui sel bakteri dari media kultur agar terhindar dari kontaminasi. Proses peremajaan bakteri dilakukan dengan mengambil sampel biakan bakteri awal sebanyak satu ose dan menggoreskannya secara zig-zag pada permukaan media. Selanjutnya, sampel tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 hingga 48 jam (Jamilatun *et al.*, 2020).

2.7.5 Suspensi Bakteri

Peremajaan *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan menyiapkan tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9%. Koloni bakteri kemudian diambil menggunakan jarum ose steril dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril tersebut. Suspensi bakteri dibuat hingga mencapai tingkat kekeruhan yang sesuai dengan standar MacFarland, yaitu 10^8 CFU/mL (Asmiilyas *et al.*, 2017).

2.7.6 Pembuatan Kontrol Positif Dan Negatif

Ekstrak kental kulit semangka sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 2 mL pelarut DMSO 10% untuk menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 100% (b/v). Larutan stok tersebut kemudian diencerkan secara bertahap (serial dilution) menggunakan DMSO 10% hingga diperoleh konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%, dengan masing-masing volume akhir 2 mL. Sebagai kontrol negatif digunakan 2 mL DMSO 10% tanpa penambahan ekstrak.

2.7.7 Uji Bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kulit semangka terhadap *Propionibacterium acnes* dilakukan menggunakan metode sumuran. Bakteri yang telah disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9% sesuai standar McFarland (10^8 CFU/mL) disebarakan secara merata pada permukaan media Mueller Hinton Agar menggunakan kapas lidi steril atau batang L. Setelah itu, sumuran dibuat pada media agar, kemudian ekstrak kulit semangka dengan variasi konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,125%. ditetaskan ke dalam sumuran menggunakan mikropipet. Kontrol positif menggunakan antibiotik klindamisin, sedangkan kontrol negatif menggunakan DMSO 10%. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24–48 jam, lalu zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diukur menggunakan jangka sorong.

Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk memastikan keakuratan hasil (Rizki *et al.*, 2022).

Diameter Daerah Hambat (DDH) yang terbentuk mencerminkan aktivitas antibakteri ekstrak kulit semangka terhadap *Propionibacterium acnes*. Nilai DDH tersebut kemudian dibandingkan dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk menilai efektivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin besar DDH yang dihasilkan, semakin kuat kemampuan ekstrak dalam menekan pertumbuhan bakteri. Apabila DDH mendekati atau bahkan melampaui kontrol positif (klindamisin), maka ekstrak dianggap memiliki potensi antibakteri yang signifikan. Sebaliknya, bila DDH yang terbentuk kecil atau tidak muncul, maka efektivitas ekstrak dalam menghambat *Propionibacterium acnes* dinilai rendah atau tidak berarti.

KHM sendiri merupakan konsentrasi terendah ekstrak yang masih mampu menghasilkan zona hambat terukur. Penentuan KHM berperan penting dalam mengevaluasi potensi ekstrak sebagai agen antibakteri alami dan dapat menjadi landasan untuk pengembangan terapi alternatif terhadap infeksi bakteri.