

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimental Laboratorium dengan tujuan utama untuk mengevaluasi karakteristik dan aktivitas antibakteri minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) terhadap *Propionibacterium acnes*. Pada penelitian ini menggunakan metode soxhletasi untuk pembuatan minyak biji labu kuning dan metode difusi cakram untuk menentukan diameter zona hambat pada minyak biji labu kuning.

#### **B. Lokasi Penelitian**

1. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo. Waktu penelitian dilaksanakan bulan November-Desember 2022.
2. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

#### **C. Subjek Penelitian**

Pada penelitian ini digunakan sampel biji labu kuning yang diperoleh dari hasil pertanian Desa Getasan, Kabupaten Semarang yang selanjutnya di ekstraksi menjadi minyak menggunakan metode soxhletasi.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### 1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang bersama variabel lain dan variabel ini dapat berubah dalam variasinya. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dengan metode soxhletasi.

##### 2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dapat dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu karakteristik (organoleptis, pH, bilangan asam, bilangan yodium skrining fitokimia) dan aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes* (diameter zona hambat).

##### 3. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat dikendalikan sehingga hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat tidak dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor luar yang tidak diteliti. Variabel yang dikendalikan pada penelitian ini yaitu waktu, sterilitas alat, suhu.

#### **E. Alat dan Bahan**

##### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat soxhletasi, blender, ayakan ukuran 60 mesh, kertas saring, jarum, benang, *rotary evaporator* (Biobase RE-2000E), botol gelap, *waterbath* (Memmert), kertas pH, erlenmeyer (Iwaki), alat titrasi, tabung reaksi (Iwaki),

penangas air, panci, beakerglass (Iwaki), pipet tetes, gelas ukur (Iwaki), autoklaf (Hirayawa), oven (Memmert), kertas/ alumunium foil, cawan petri, jarum ose, *laminar air flow* (Airtech), inkubator (Memmert), pinset, jangka sorong, corong kaca, pembakar spirtus, label, mikropipet (Socorex), vortex mixer (DLAB), *McFarland Densitometer* (Biosan), cakram (Oxoid).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji labu kuning, bakteri *Propionibacterium acnes* (Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Sultan Agung), n-heksan (PT. Brataco, teknis), kloroform (PT. Bina Usaha Mandiri, teknis), kalium iodide 15%, amilum (PT. Bina Usaha Mandiri, food), natrium tiosulfat 0,1 N (PT. Bina Usaha Mandiri, teknis) , etanol 96% (PT. Indolab Karya Sahati, food) , fenolftalein (PT. Bina Usaha Mandiri, Pro analisis), NaOH 0,1 N (PT. Bina Usaha Mandiri, food), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PT. Bina Usaha Mandiri, Pro analisis), asam klorida 2 N (PT. Bina Usaha Mandiri, food), feriklorida 1% (PT. Bina Usaha Mandiri, teknis) , aqua pro injeksi (PT. Ikapharmindo Putramas, food), nutrient agar (PT. Bina Usaha Mandiri, food), NaCl 0,9% (PT. Widatra bhakti, food).

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas

Diponegoro Semarang untuk mengidentifikasi kebenaran dari biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) yang akan digunakan dalam penelitian.

## 2. Proses pembuatan minyak

### a. Persiapan bahan

Biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) disiapkan dan dilakukan sortasi basah dengan cara memisahkan bagian biji labu kuning yang tidak terpakai dan rusak. Biji labu kuning dicuci dengan air yang mengalir kemudian dikeringkan terlebih dahulu dengan cara dianginkan pada suhu kamar (15-30°C) yang terlindungi dari matahari kurang lebih  $\pm$  3 hari untuk menghilangkan kadar air didalam biji labu kuning. Biji labu kuning yang sudah dianginkan dihaluskan menggunakan alat blender, setelah diblender diperoleh serbuk halus yang diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 60 mesh kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode cara panas yakni metode soxhletasi (Julianty *et al.*, 2021).

### b. Pembuatan ekstrak minyak biji labu kuning

Serbuk biji labu kuning ditimbang sejumlah 75 gram kemudian dimasukkan dalam kantung yang terbuat dari kertas saring dan dimasukkan dalam alat soxhletasi untuk proses ekstraksi. Serbuk biji labu kuning diekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 300 ml, dilakukan proses ekstraksi dilakukan selama 1 jam dengan suhu 60°C (Panjaitan *et al.*, 2015).

Ekstrak minyak biji labu kuning yang berwarna hijau kekuningan kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 60°C. Penguapan dilakukan diatas *waterbath* selama 3 hari pada suhu 60°C untuk menghilangkan bau n-heksan. Setelah itu masukan dalam botol gelap dan disimpan pada suhu ruang.

### 3. Uji bebas pelarut n-heksan

Uji bebas pelarut n-heksan dilakukan mengambil 2 ml minyak biji labu kuning ke dalam tabung reaksi, dibakar di atas api bunsen dan amati terhadap bau n-heksan yang dihasilkan hilang, apabila masih terdapat bau n-heksan maka perlu dilakukan penguapan kembali (Zahra *et al.*, 2020).

### 4. Uji karakteristik minyak biji labu kuning

#### a. Uji organoleptis

Uji organoleptis yang dilakukan mengamati secara visual atau dengan panca indra meliputi warna, bau dan bentuk pada sediaan minyak biji labu kuning. Standar warna pada minyak biji labu kuning yaitu intensitas warna kekuningan muda pada pergeseran biru ke kuning (Abdillah *et al.*, 2014).

#### b. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH ke dalam sediaan minyak biji labu kuning kemudian dicocokkan dengan indikator pH dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Syarat mutu pH

minyak goreng (minyak nabati) menurut SNI (IS: 6357-1971) berkisar pH 6,5-8.

c. Bilangan yodium

Uji bilangan yodium dengan menimbang 0,5 gram minyak, dimasukan ke dalam erlenmeyer ukuran 100 ml, ditambahkan larutan kloroform 10 ml dan 25 ml iodin-klorida. Campuran larutan tersebut disimpan pada tempat yang gelap selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan dengan kalium iodida 15% sebanyak 10 ml dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 50 ml. Titrasi dilakukan dengan larutan natrium tiosulfat sampai berubah menjadi warna coklat muda, setelah itu ditambahkan dengan indikator amilum 3-4 tetes. Titrasi dilakukan sampai warna biru kehitaman hilang. Untuk larutan blanko dilakukan cara yang sama dan dilakukan pengulangan sebanyak 3x (Jacobs, 1973).

Untuk menghitung bilangan yodium, digunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Bilangan yodium} = \frac{126,9 (Vb - Vs)N}{10W}$$

Keterangan :

Vb : volume blanko (ml)

Vs : volume sampel (ml)

N : normalitas iodium (0,1N)

W : berat sampel yang digunakan (gram)

Standar yodium menurut Standar Nasional Indonesia (SNI)-3741-2013 maksimal 45-46 g Iod/100 g.

d. Bilangan asam

Uji bilangan asam dilakukan dengan cara menimbang 0,2 gram minyak kemudian ditambahkan dengan etanol 96% panas sebanyak 2,5 ml yang ditambahkan larutan indikator fenolftalein 2-3 tetes digojok sampai homogen dalam erlenmeyer 100 ml. Larutan dititrasikan dengan menggunakan larutan NaOH standar 0,1 N sambil digojok hingga mendapatkan warna merah jambu dan dilakukan pengulangan sebanyak 3x (AOCS, 1997).

Untuk menghitung bilangan asam, digunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Bilangan asam (\%)} = \frac{(\text{ml NaOH} \times n \times 40)}{\text{Berat sampel (g)}}$$

Standar bilangan asam menurut standar nasional Indonesia (SNI)-3741-2013 maksimal 0,6 mg KOH/g.

e. Skrining fitokimia

1. Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan memasukan ekstrak minyak biji labu kuning ke dalam tabung reaksi 3-7 tetes ditambahkan dengan beberapa tetes larutan asam sulfat pekat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Perubahan warna yang terjadi diamati, jika larutan berubah menjadi warna merah tua atau kuning menandakan adanya senyawa flavonoid (Harbone, 1987)

## 2. Tanin

Uji tanin dilakukan dengan menimbang sampel ekstrak minyak biji labu kuning sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan juga beberapa tetes feriklorida 1%. Terbentuknya warna coklat kehijauan menunjukkan adanya senyawa tanin (Pelu *et al.*, 2020)

## 3. Saponin

Uji saponin dilakukan dengan menimbang sampel ekstrak minyak biji labu kuning sebanyak 250 mg dimasukkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 5 ml air hangat, dikocok kuat, apabila terbentuk buih yang menetap serta saat ditetesi 1 tetes asam klorida 2 N buih masih ada maka serbuk tersebut mengandung saponin (DepKes RI, 1995).

## 5. Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

### a. Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi alat yang digunakan menggunakan metode panas kering (oven) yang dibungkus dengan aluminium foil atau kertas dan disterilkan pada suhu 200°C selama 60 menit. Untuk bahan medium dilakukan sterilisasi menggunakan metode pemanasan basah dengan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

### b. Pembuatan media

Pembuatan media untuk pembiakan bakteri dilakukan dengan cara menimbang 0,2 gram nutrient agar kemudian di



larutkan menggunakan aquadest kedalam erlemeyer sebanyak 10 ml, setelah itu erlenmeyer ditutup menggunakan alumunium foil dan disterilkan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL untuk agar miring ditunggu sampai dingin dan padat.

Pembuatan media untuk uji aktivitas bakteri dilakukan dengan cara menimbang 2 gram nutrient agar, kemudian dilarutkan menggunakan aquadest kedalam erlemeyer sebanyak 100 ml, setelah itu erlenmeyer ditutup menggunakan alumunium foil, kemudian disterilkan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media tersebut dituangkan ke cawan petri masing-masing berisi 15 mL.

c. Pembiakan bakteri

Pembiakan bakteri dilakukan dengan cara bakteri *Propionibacterium acnes* diambil dengan menggunakan kapas lidi steril kemudian ditanamkan pada media agar miring dan diinkubasikan menggunakan inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

d. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri dapat dilakukan dengan cara bakteri yang telah diinokulasikan diambil 1 ose menggunakan jarum ose steril kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 10 ml. Kekeruhan suspensi

diuji kesetaraan dengan standar 0,5 *Mc.Farland* (diperkirakan  $1,5 \times 10^8$  sel bakteri/ml).

e. Kontrol positif dan kontrol negatif

Kontrol positif menggunakan antibiotik doksisisiklin 30  $\mu\text{g/disk}$  dan klindamisin 10  $\mu\text{g/disk}$  dan kontrol negatif menggunakan aquadest steril 10  $\mu\text{L}$ .

f. Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara media agar yang sudah memadat dicelupkan kapas lidi steril pada larutan suspensi, kemudian ditunggu sebentar agar cairan meresap pada kapas. Kapas lidi diangkat dan diperas dengan sedikit menekan lidi pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar, lalu digoreskan pada seluruh media agar. Untuk memperoleh hasil yang maksimal maka, ditunggu selama 5 menit supaya bakteri bisa masuk ke dalam media. Cakram disiapkan kemudian ditetesi dengan minyak biji labu kuning hasil soxhletasi dan minyak biji labu kuning merk Tsbali pada masing-masing cakram sebanyak 10  $\mu\text{L}$ . Untuk kontrol negatif cakram ditetesi dengan aquadest sebanyak 10  $\mu\text{L}$ . Kontrol positif menggunakan cakram yang mengandung antibiotik klindamisin 10  $\mu\text{g/disk}$  dan antibiotik doksisisiklin 30  $\mu\text{g/disk}$ . Media inokulum yang telah disiapkan, ditanami dengan cakram menggunakan pinset steril yang sudah ditetesi dengan larutan uji yang diletakan pada masing-masing label dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

Pertumbuhan bakteri uji diamati dengan mengukur diameter hambatan yang terbentuk.

g. Pengukuran diameter zona hambat

Pengukuran pada diameter zona hambat dilakukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk. Pada saat pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong untuk mengetahui nilai zona hambat. Menurut Susanto, Sudrajat dan Ruga (2012) kategori zona hambat yaitu diameter  $\leq 5$  mm (lemah), diameter 6-10 mm (sedang), diameter 11-20 mm (kuat), diameter  $\geq 21$  mm (sangat kuat).

## G. Analisis Data

Untuk karakteristik, skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri pada minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dilakukan analisis data secara deskriptif.