

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental dengan tujuan utama untuk mengetahui uji aktivitas antibakteri minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne) sebagai antibakteri terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstraksi minyak menggunakan metode soxhletasi, sehingga dapat diketahui karakteristik fisik minyak biji labu kuning berupa uji organoleptis, kadar air, bobot jenis, dan bilangan penyabunan. Uji aktivitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode difusi cakram dengan 5 kelompok perlakuan dan 3 replikasi.

B. Lokasi Penelitian

Uji aktivitas antibakteri minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne) terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Kimia Universitas Ngudi Waluyo. Waktu penelitian dilaksanakan bulan Desember 2022- Januari 2023

C. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan pada penelitian ini adalah biji labu kuning yang diperoleh dari hasil pertanian desa Getasan, Kabupaten Semarang untuk

di uji karakteristik fisik dan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah minyak biji labu kuning menggunakan pelarut ekstraksi n-heksan.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik fisik minyak biji labu kuning (organoleptis, kadar air, bobot jenis, dan bilangan penyabunan) dan aktivitas antibakteri dengan parameter diameter zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Variabel Terkendali

Variabel kontrol pada penelitian ini yaitu pelarut ekstraksi, metode ekstraksi, metode uji antibakteri, suhu sterilisasi alat, suhu inkubasi 37⁰C, kadar air minyak biji labu kuning.

E. Alat dan Bahan

1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah soxhlet, kondensor, corong, kertas saring, gelas ukur 100 mL (Iwaki), gelas beaker 250 mL (Pyrex), Erlenmeyer 250 mL (Pyrex/Iwaki), tabung reaksi (Pyrex), rak tabung, oven (Memmert UN-30), *autoclave* (Hiramaya), piknometer suhu, *rotary evaporator* (RE100-PRO), *waterbath* (Nesco-lab), timbangan

analitik (HZY/Ohaus), *hot plate* (Maspion S-301), cawan porselin, cawan petri, inkubator (Memmert), jangka sorong, buret, statif dan klem, pipet tetes, mikro pipet, jarum ose, pinset, kertas cakram, LAF (*Laminar Air Flow*) (Airtech), *moisture analyzer* (Ohaus).

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu biji labu kuning, pelarutan n-heksana, KOH, etanol 96% (Toko Kimia Indrasari), minyak biji labu pabrik (PT. Tamba Sanjiwani), aquadest (Toko Kimia Indrasari), indikator PP (*Phenolphthalein*), HCl 0,5N (Toko Kimia Indrasari), kultur bakteri *Staphylococcus aureus* (Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Sultan Agung), media NA (Nutrien Agar), NaCl 0,9% (Toko Kimia Indrasari), cotton swab, cakram doksisisiklin.

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Dalam penelitian ini langkah pertama yang dilakukan yaitu determinasi tanaman untuk menghindari kesalahan dalam penelitian. Tanaman yang berupa buah, kulit, biji digunakan dan dilakukan determinasi. Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi Dan Biosistemika Fakultas Sains dan Matematika Departemen Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pengumpulan Bahan

Biji Labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne) yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari ekstraksi hasil pertanian Desa Getasan Kab. Semarang.

3. Penyiapan Bahan

Buah labu kuning (*Cucurbita moschata* Duchesne) dibelah kemudian diambil biji dari buah labu, selanjutnya dilakukan sortasi basah. Biji labu kuning kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan selama tiga hari pada suhu kamar untuk mengurangi kadar airnya. Biji labu kuning yang telah kering kemudian dikupas kulitnya dan diambil biji bagian dalam untuk di haluskan dengan cara di blender, selanjutnya dilakukan penyaringan serbuk dan diayak dengan ukuran 40/60 mesh untuk mendapat serbuk biji (Julianty *et al.*, 2021).

4. Pembuatan Minyak Biji Labu Kuning dengan Metode Soxhlet

Sebanyak 75 g serbuk biji labu kuning dikemas dalam kertas saring dan dimasukkan ke dalam soxhlet. Kemudian diekstraksi menggunakan n-heksan sebanyak 300 mL. Ekstraksi soxhlet dilakukan pada suhu 80-100°C hingga pelarut yang merendam sampel terlihat jernih. Proses ekstraksi minyak biji labu dilakukan sebanyak 10 siklus hingga pelarut menjadi jernih. Hasil ekstraksi minyak biji labu kuning yang berwarna hijau kekuningan kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan pengurangan tekanan, setelah itu dilakukan penguapan kembali diatas *waterbath*. Minyak biji labu kuning yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam

botol gelap yang tertutup dan disimpan pada suhu ruang (Panjaitan *et al.*, 2015).

5. Pengujian Karakteristik Minyak Biji Labu Kuning

a. Organoleptis

Uji organoleptis, biasanya disebut sebagai pengujian sensorik, adalah teknik pengujian yang terutama menggunakan indera manusia untuk mengukur penerimaan terhadap suatu produk. Indera yang digunakan dalam pengujian sensorik adalah indera penglihatan, penciuman, rasa, dan sentuhan (Gusnadi *et al.*, 2021). Uji organoleptis meliputi uji bentuk, warna, rasa, dan bau.

b. Bobot Jenis

Berdasarkan penelitian (Furqan *et al.*, 2018) bobot jenis minyak biji labu yaitu 0,9. Nilai tersebut menunjukkan bahwa bobot jenis minyak lebih kecil dari bobot jenis air. Pengukuran bobot jenis minyak menggunakan piknometer suhu. Penentuan bobot jenis dilakukan dengan membersihkan piknometer suhu dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian ditimbang berat kosong dari piknometer suhu. Pengukuran bobot jenis dilakukan dengan cara: mengisi piknometer suhu dengan minyak hingga tidak terdapat rongga udara kemudian ditimbang, setelah itu minyak dan piknometer suhu direndam menggunakan air es hingga suhu menjadi 25°C dan ditimbang (Ariani *et al.*, 2017). Berat jenis minyak dihitung dengan menggunakan rumus:

Bobot Jenis =

$$\frac{\text{Bobot pikno dan minyak (gram)} - \text{Bobot Pikno kosong (gram)}}{\text{Voume Minyak Pada Suhu 25C (gram)}}$$

c. Kadar Air Serbuk dan Minyak Biji Labu Kuning

Kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah atau kandungan air dalam suatu bahan (Julianty *et al.*, 2021). Penentuan kadar air serbuk biji labu kuning dengan menggunakan alat *Moisture analyzer* dengan cara: sampel serbuk ditimbang sebanyak 3 g, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam wadah *Moisture analyzer*, setelah itu tutup *Moisture analyzer* dan biarkan hingga proses perhitungan kadar air selesai, kadar air serbuk yaitu tidak lebih dari 10% (Fikriyah *et al.*, 2021).

Metode gravimetri digunakan untuk menentukan kadar air minyak. Tahap awal dalam penentuan kadar air adalah timbang 10 g minyak dalam cawan porselin, setelah itu oven selama 1 jam pada suhu 105°C hingga kandungan air dalam minyak menguap. Cawan tersebut kemudian ditimbang hingga berat konstan (Julianty *et al.*, 2021). Penentuan kadar air minyak dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar air \%} = \frac{(A-B)}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

- A: Bobot sampel + cawan sebelum pemanasan (g)
 d. B: Bobot sampel + cawan setelah pemanasan (g)
 C: Bobot Sampel Sebelum Pemanasan (

Angka penyabunan adalah jumlah mg kalium hidroksida (KOH) yang diperlukan untuk menyabunkan ester dan menetralkan asam lemak bebas yang ada dalam 1,0 g zat. Prosedur bilangan penyabunan dengan cara: sebanyak 1,5 g minyak ditimbang kemudian dimasukkan dalam erlenmayer 250 mL. setelah itu tambahkan 25 mL larutan KOH-etanol 0,5 N. Kemudian panaskan menggunakan *waterbath* selama 30 menit dan diaduk hingga homogen. Setelah 30 menit diamkan sebentar kemudian ditambahkan 3 tetes indikator PP dan titrasi kelebihan KOH-etanol 0,5 N dengan HCl 0,5 N. setelah itu dicatat volume titrannya dan lakukan replikasi sebanyak 3 kali. Lakukan penetapan blanko tanpa menggunakan minyak (Julianty *et al.*, 2021). Penentuan bilangan penyabunan dengan rumus:

$$\text{Bilangan Penyabunan:} = \frac{56,11 (V \text{ blanko} - V \text{ titran}) N}{W}$$

Keterangan:

56,11 = Bobot molekul Kalium hidroksida (KOH)

V = Volume

N = Normalitas asam klorida

W = bobot minyak (g)

6. Uji antibakteri

a. Stelisisasi alat

Alat-alat gelas, jarum ose dan pinset disterilkan dalam oven pada suhu 170°C selama ± 2 jam, sebelum digunakan jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara dibakar di atas api menggunakan spiritus. Untuk alat-alat karet seperti pipet tetes, disanitasi dengan cara

direbus. Media NA yang telah dibuat disterilkan menggunakan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Fiana *et al.*, 2020).

b. Pembuatan media pertumbuhan bakteri

Media pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan media NA (Nutrient Agar). Media NA ditimbang sebanyak 2,8 gram kemudian ditambahkan 100 mL akuades. Setelah dipanaskan di atas *hotplate* dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*, kemudian media NA disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media NA dimasukkan secara steril ke dalam cawan petri dan didiamkan pada suhu ruang hingga memadat (Juariah & Tiana, 2021).

c. Inokulasi bakteri

Biakan bakteri *Staphylococcus aureus* diambil sebanyak satu ose menggunakan jarum ose yang sudah disterilkan dengan cara dibakar, kemudian bakteri diinokulasikan ke dalam media agar NA yang telah membeku pada tabung reaksi dengan metode miring secara aseptis dan terpisah dengan menggoreskan jarum ose yang mengandung biakan bakteri pada dasar kemiringan agar dan ditarik dengan gerakan zigzag (metode streak). Selanjutnya media miring NA diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Angelina *et al.*, 2015).

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri yang telah diinkubasi, diambil menggunakan jarum ose yang dibakar terlebih dahulu sebanyak dua sampai tiga ose sampel bakteri pada media NA (Nutrient Agar) kemudian diencerkan dengan 10 mL larutan NaCl 0,9% steril sampai kekeruhannya sama dengan larutan standar 0,5 McFarland (Fiana *et al.*, 2020).

e. Pengujian Antibakteri Minyak Biji Labu Kuning

Metode difusi cakram digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dengan diameter kertas cakram 6 mm. Cawan petri diisi dengan 20 mL media NA yang telah dipanaskan dan dibiarkan hingga memadat. Bakteri uji diusap menggunakan cotton swab pada media Na yang telah memadat secara merata dan aseptis, metode ini dinamakan dengan metode swap (Angelina *et al.*, 2015).

Media NA yang telah dibiakkan bakteri pada cawan petri diletakkan kertas cakram yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Cawan petri kemudian diisi dengan kertas cakram, dalam satu cawan petri diisi dengan empat kertas cakram dengan kontrol perlakuan yang sama. Kertas cakram sebelum ditempatkan pada media NA terlebih dahulu ditetaskan sebanyak 10 μ L masing-masing kelompok uji pada cawan petri steril menggunakan mikropipet. Media NA yang telah berisi kertas cakram kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian dilakukan pengamatan dan mengukur zona hambat yang telah berkembang pada 24 jam (Angelina *et al.*, 2015). Terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram

menunjukkan adanya zona hambat bakteri. Diameter zona hambat dapat diukur menggunakan jangka sorong.

G. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menentukan karakteristik fisik dan aktivitas antibakteri minyak biji labu kuning. Karakteristik fisik dianalisis secara deskriptif pada uji organoleptis, berat jenis, kadar abu, kadar air, dan uji bilangan penyabunan. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram untuk mengetahui diameter zona hambat pertumbuhan bakteri menggunakan kontrol positif antibiotik doksisisiklin dan kontrol negatif menggunakan aquadest. Diameter zona hambat minyak biji labu kuning dianalisis menggunakan SPSS 25.0 menggunakan uji *Shapiro-wilk* dan *one-way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%.