

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental yang dilakukan secara laboratorium yaitu untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) pada sabun mandi padat sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Metode ekstraksi dingin meserasi digunakan untuk mengekstraksi kandungan yang terdapat dalam kulit buah semangka yaitu menggunakan pelarut etanol 96%. Pengujian anti bakteri pada sabun mandi padat menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi buah semangka (*Citrullus lanatus*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) dan pengujian skrining fitokimia ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pembuatan sabun mandi padat dari ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) dan pengujian mutu fisik sabun mandi padat dari ekstrak kulit buah semangka dilakukan di Laboratorium Teknologi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* sabun mandi padat dari ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) yang didapatkan dari toko buah daerah Ungaran, Jawa Tengah.

D. Definisi Operasional

1. Jenis semangka yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit berwarna hijau muda dengan pola garis-garis, daging buah berwarna merah dan memiliki biji yang diperoleh dari Ungaran
2. Simplisia kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) dilakukan proses pengeringan menggunakan panas matahari tidak langsung dan oven.
3. Ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) di buat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath*
4. Pengujian mutu fisik sabun padat ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) meliputi uji organoleptik, pH, uji tinggi busa dan stabilitas busa,
5. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian adalah konsentrasi ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) dengan konsentrasi sebesar 3%, 6%, 9%.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian adalah

- a. Mutu fisik sabun mandi padat ekstrak kulit buah semangka (*Citrulus lanatus*) memiliki parameter uji organoptik (warna, bau, tekstur), pH, tinggi busa, stabilitas busa, kadar air, kadar abu.
- b. aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* memiliki parameter diameter zona hambat (mm) pada uji difusi cakram.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian adalah proses maserasi, suhu penguapan pelarut, konsentrasi komponen bahan, jenis bakteri.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (OHAUS), *Moisture analyzer* (OHAUS), rotary evaporator (RE100-Pro), *waterbath* (Mettler), corong, pipet tetes, pipet ukur (IWAKI), *beaker glass* (IWAKI), batang pengaduk, blender (Maspion), mesh ukuran 40, aluminium foil, botol kaca, gelas ukur (IWAKI), tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, botol kaca, corong pisah (Pyrex), spatula, pH meter (OHAUS), kaca objek (one lab), cawan petri, kertas cakram, cawan porselin, oven (binder), autoklaf (Hirayama), Laminar airflow (LAF) (AIRTECH), Erlenmeyer, bunsen, jangka sorong (DonWori), inkubator (Mettler), mikroskop (optika Microscopes italy), McFarland densitometer (biosan), fortex (DLAB mx-s).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*), minyak kelapa (pro analisis), minyak zaitun (pro analisis), NaOH (pro analisis), cocamide DEA (pro analisis), aquadest (pro analisis), HCl 2 N, pereaksi Dragendrof, pereaksi Mayer, pereaksi FeCl₃ 1% (ferric chloride), pereaksi Bouchardat, HCl pekat, serbuk magnesium, nutrient agar, alkohol 96% (teknis), larutan iodine, ungu violet,

G. Prosedur kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pembuatan ekstrak kulit buah semangka

Pembuatan ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) menggunakan metode ekstraksi dingin yaitu maserasi dengan perbandingan 1: 10. Serbuk daging buah semangka disiapkan 300 gram dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 2250 mL dengan perbandingan 1:7,5, dimasukkan ke dalam chamber gelap. Serbuk daging putih buah semangka yang sudah direndam diaduk setiap 6 jam sekali dan didiamkan selama 5 hari terlindungi dari cahaya, filtrat disaring menggunakan kain flannel yang akan menghasilkan ekstrak cair (Syakri *et al.*, 2019). Residu dari proses maserasi di remaserasi dengan perbandingan 1:2,5 menggunakan etanol 96% sebanyak 750 mL ke dalam chamber gelap. Setiap 6 jam sekali diaduk dan

rendam selama 24 jam. Dicampurkan hasil filtrat maserasi dan remaserasi kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak cair dilanjutkan penguapan pada suhu 70°C menggunakan *waterbath* selama beberapa hari hingga diperoleh ekstrak kental (Yunita & Khodijah, 2020). Maserasi dilakukan dalam ruang gelap untuk mencegah degradasi senyawa aktif yang bersifat fotosintesis, seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin sehingga kualitas ekstrak tetap terjaga secara optimal

3. Standarisasi Non Spesifik Simplisia

a. Uji Kadar air

Uji kadar air menggunakan alat *Moisture Analyzer* untuk mengetahui kandungan air di dalam simplisia kulit buah semangka. Ditimbang sebanyak 2 gram simplisia kulit buah semangka lalu di masukkan ke dalam alat *Moisture Analyzer* yang telah disiapkan pada suhu 40°C selama 5 menit (Dewi *et al.*, 2023).

b. Kadar abu

Ditimbang sebanyak 2 gram simplisia, lalu dimasukkan ke dalam krus untuk dibakar dalam *furnance* pada suhu 600°C selama 1 jam. Setelah itu, didinginkan, ditimbang kembali dan hitung persentase kadar abu (Rahayu, 2021).

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{krush beserta isi} - \text{krush kosong}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

4. Standarisasi Non Spesifik dan Spesifik Ekstrak

a. Uji organoleptik

Uji organoleptik dengan cara mengamati fisik dari ekstrak kulit buah semangka menggunakan pancaindera. Diamati dari segi bentuk, bau, dan warna dari ekstrak kulit buah semangka.

b. Alkaloid

Ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) di timbang sebanyak 0,5 gram ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan uji dengan pereaksi Dragendrof sebanyak 2-3 tetes, jika terdapat endapan merah maka positif adanya alkaloid. Lalu ditambahkan dengan 2-3 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan kuning maka positif mengandung senyawa alkaloid (Cantika *et al.*, 2023).

c. Flavonoid

Ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) ditimbang sebanyak 0,5 gram ditambahkan dengan etanol kemudian dipanaskan selama \pm 5 menit dan tambahkan HCl pekat 10 tetes dan 0,2 serbuk magnesium. Jika terlihat perubahan warna menjadi kuning, jingga, atau merah menunjukkan adanya flavonoid (Astuti *et al.*, 2023).

d. Saponin

Ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air suling dikocok kuat-kuat. Jika

terdapat buih atau busa dapat ditambahkan 1-3 tetes HCl 1% jika busa tetap bertahan maka positif mengandung saponin (Khafid *et al.*, 2023).

e. Tanin

Ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) sebanyak 0,5 gram ditambahkan 3 mL air hangat, kemudian ditambahkan 1-3 tetes FeCl₃ 1%. Jika berwarna biru atau hitam kehijauan maka positif tanin (Khafid *et al.*, 2023).

5. Standarisasi Non Spesifik Ekstraksi

a. Uji Kadar Air

Ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) ditimbang sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam *Moisture Analyzer* dengan suhu kurang lebih 105°C selama 10 menit hingga nilai LOD (*Loss on Drying*) muncul (Rachmayani *et al.*, 2015).

b. Kadar Abu

Ekstrak kulit buah semangka ditimbang sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam krus platina atau krus silika yang telah dipijarkan dan ditara. Ekstrak kulit buah semangka yang didalam krus platina atau krus silika dimasukkan ke dalam tanur pengabuan dan dipijarkan dengan suhu 600°C selama 3 jam sampai abu kemudian didinginkan dan ditimbang (Rachmayani *et al.*, 2015).

6. Formula sabun mandi padat

Kulit buah semangka mengandung senyawa bioaktif yang memiliki potensi untuk meningkatkan kualitas fisik serta aktivitas antibakteri dalam

produk sabun mandi padat. Formula berikut mengacu pada jurnal (Yusuf *et al.*, 2021) dan (Febriani *et al.*, 2021) dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formula Sabun Mandi Padat Ekstrak Kulit Semangka

No	Nama bahan	Jumlah Bahan (%)			Fungsi
		FI	FII	FIII	
1.	Ekstrak kulit buah semangka	3	6	9	Bahan aktif alami
2.	Minyak Kelapa	22	22	22	Agen pembersih
3.	Minyak Zaitun	15	15	15	Pelembap alami
4.	NaOH	8,9	8,9	8,9	Agen alkali
5.	Cocamide DEA	0,1	0,1	0,1	Surfaktan dan penstabil busa
7.	Aquadest ad	100	100	100	Pelarut

Keterangan: FI = formula I, FII= foemula II, FIII= formula III

7. Pembuatan sabun mandi padat

Pembuatan sabun mandi padat dimulai dengan mencampurkan NaOH dan aquadest untuk membentuk campuran 1. Fase minyak dengan mencampurkan minyak kelapa dan minyak zaitun ke dalam *beaker glass* lalu diaduk hingga rata menggunakan homogenizer (campuran 2) Setelah itu, campuran 1 ditambahkan cocamide DEA diaduk hingga homogen (campuran 3) kedalam campuran 2 diaduk kembali hingga homogen. Lalu ditambahkan ekstrak kulit buah semangka dengan konsentrasi 3% (FI), 6% (FII), dan 15% (FIII) ditambahkan masing-masing ke dalam campuran 3 hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan pewarna diaduk hingga homogen kemudian dituangkan ke dalam cetakan sabun lalu didiamkan

hingga mengeras selama 4-6 minggu. Pembuatan sabun mandi padat menggunakan metode cold process. (Febriani *et al.*, 2021).

8. Pengujian Mutu Fisik Sabun Mandi Padat

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dengan cara mengamati fisik dari sediaan sabun mandi padat yang telah diformulasi menggunakan panca indera. Diamati dari segi bentuk, bau, dan warna dari sabun (Febriani *et al.*, 2021).

b. Uji pH

Pengukuran pH menggunakan alat pH meter digital, sebanyak 1 gram sabun dilarutkan dengan 10 mL aquadest. Alat dikalibrasi dengan menggunakan elektroda pada pH 4, 7, 9 sehingga posisi jarum alat menunjukkan angka pH tersebut (Febriani *et al.*, 2021).

c. Uji stabilitas dan tinggi busa

Ditimbang 1 gram sabun ditambahkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL aquadest, lalu dihomogenkan menggunakan vortex selama 1 menit. Tinggi busa yang terbentuk diukur dengan penggaris sebagai tinggi busa awal. Setelah dibiarkan selama 5 jam, tinggi busa diukur kembali sebagai tinggi busa akhir (Febriani *et al.*, 2021).

$$\text{Stabilitas busa (\%)} = \frac{\text{tinggi busa awal} - \text{tinggi busa akhir}}{\text{tinggi busa awal}} \times 100\%$$

9. Pengujian Aktivitas Antibakteri Sabun Mandi Padat Terhadap Bakteri

Staphylococcus aureus

a. Sterilisasi Alat

Bahan yang akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri disterilkan menggunakan *autoclave* suhu 121°C selama 15 menit. Tabung reaksi disterilkan dengan oven, pada suhu 180-200°C selama 1 jam dan jarum ose dibakar dengan nyala bunsen (Magvirah *et al.*, 2020)

b. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Ditimbang nutrient agar (NA) sebanyak 11,2 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambahkan aquadest sebanyak 400 mL diaduk hingga rata dan dipanaskan sampai larut, setelah itu disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit ditunggu dingin antara 45°C. Lalu dibagikan ke dalam 11 cawan petri, masing-masing 30 mL ditunggu hingga memadat (Irawanda *et al.*, 2024).

c. Identifikasi bakteri

Kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, lalu diambil bakteri dengan jarum ose secara septik dan dioleskan pada kaca kemudian ditetesi dengan ungu violet (gram A) dan dibiarkan selama 1 menit, setelah itu dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Bakteri tersebut ditetesi dengan larutan iodine (gram B) dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering Kemudian ditetesi alkohol 95% (gram C) selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir, dianginkan dan dikeringkan setelah itu dilakukan penetesan safranin (gram D) selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir

dikeringkan kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Bakteri positif akan terlihat dengan warna ungu.

d. Peremajaan bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murninya diambil sebanyak 1 ose pada media Nutrient Agar (NA) dengan digores secara zig-zag. Lalu diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Irawanda *et al.*, 2024).

e. Pembuatan suspensi

Bakteri *Staphylococcus aureus* diambil sedikit demi sedikit dengan menggunakan ose bulat, lalu disuspensikan tabung reaksi yang telah diisi NaCl 0,9% sebanyak 10 mL, kemudian suspensi tersebut dibandingkan kekeruhannya hingga sama dengan standar McFarland 0,5 (Irawanda *et al.*, 2024).

f. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Disiapkan 11 cawan petri kemudian masing-masing diisi dengan media nutrient agar (NA) sebanyak 30 mL. dibiarkan media nutrient agar (NA) memadat selama 15 menit, kemudian dilakukan perendaman kertas cakram pada masing-masing formula dengan konsentrasi yang berbeda (3, 6 dan 9%).

Selain itu, disiapkan kontrol positif berupa sabun dettol antibakteri yang dijual di toko dan kontrol negatif menggunakan basis sabun sebanyak 1 gram dilelehkan selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan proses pemipetan suspensi bakteri menggunakan mikropipet

sebanyak 100 μ L dan digoyang-goyangkan ke cawan petri searah jarum jam untuk menghasilkan bakteri tersebar merata pada media nutrient agar (NA). Kertas cakram yang sudah direndam selama 15 menit (Zannah et al., 2025) pada masing-masing perlakuan diletakkan di atas media agar yang telah dituang bakteri *Staphylococcus aureus* dengan pengulangan 3 kali setelah itu cawan petri ditutup dan diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi tutup cawan terbalik (Anggraini et al., 2023).

g. Pengamatan Hasil Aktivitas Antibakteri

Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar cakram, yang menunjukkan adanya efek penghambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong untuk mengetahui daya hambat atau zona bening yang dihasilkan, dengan hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) (Anggraini et al., 2023).

H. Analisis Data

Analisis data statistik menggunakan *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) Statistics 22. Analisis yang dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Pengujian normalitas menggunakan *Shapiro wilk*, nilai signifikan pada uji normalitas yaitu $> 0,05$ dan sebaliknya jika nilai tidak normal maka nilai signifikan $<0,05$ (Tandi et al., 2019). Pengujian homogenitas menggunakan uji *levene's test* dan dilanjutkan dengan uji

parametrik ANOVA satu arah. Nilai signifikan yang diperoleh $> 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan. Sebaliknya jika nilai signifikan diperoleh $< 0,05$ maka dalam data terdapat perbedaan. Selanjutnya dilakukan Uji *Post Hoc Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar perlakuan (Tandi *et al.*, 2019).