

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Februari 2026 yang berlokasi di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi, Kota Tasikmalaya.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat dan bahan untuk uji *in silico***

Alat yang digunakan dalam pengujian *in silico* diantaranya laptop hp dengan spesifikasi RAM 4 GB, *Processor* AMD Athlon Silver 3050U with Radeon Graphics Up to 2,3 GHz, serta laptop ini terhubung dengan koneksi internet. Adapun perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini yaitu aplikasi PyRx, Biovia Discovery Studio, dan cropCSM ([https://biosig.lab.uq.edu.au/crop\\_csm/](https://biosig.lab.uq.edu.au/crop_csm/)) sebagai alat untuk memprediksi toksisitas senyawa, SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) untuk kebutuhan data *screening pesticide likeness*, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), dan PDB (Protein Data Bank) (<https://www.rcsb.org/>) digunakan untuk data *mining* senyawa ligan dan protein.

Bahan yang digunakan dalam pengujian ini diantaranya struktur 2D dari senyawa ligan kontrol, struktur 3D dan 2D dari senyawa ligan hasil GC-MS pada ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*), dan struktur 3D reseptor.

##### **3.2.2 Alat dan bahan untuk uji *in vitro***

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi, gelas ukur, *petridish*, erlenmeyer, aluminium foil, *plastic wrap*, spatula, pinset, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, bunsen, kompor gas, autoklaf, *laminar airflow*, jangka sorong digital, suntikan, wadah plastik, botol kaca, corong, kertas saring, oven, alat tulis, penggaris, dan label. Adapun bahan yang digunakan dalam pengujian ini diantaranya ekstrak kulit buah semangka, alkohol, aquadest, biakan murni *Fusarium oxysporum*, dan media *potato dextrose agar* (PDA).

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu percobaan secara *in silico* dan percobaan secara *in vitro*, sebagai berikut:

#### 3.3.1 *In silico*

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif dengan melakukan analisis prediksi kemiripan senyawa dengan pestisida yang telah terdaftar serta evaluasi potensi toksisitas guna menilai keamanan dan kelayakan senyawa sebagai agen antijamur alternatif. Lalu dilakukannya juga *molecular docking* untuk mengetahui penambatan ligan dari senyawa metabolit sekunder pada ekstrak kulit buah semangka (*Citrullus lanatus*) terhadap reseptor yang berperan penting dalam proses infeksi *Fusarium oxysporum* terhadap tanaman kelor.

#### 3.3.2 *In vitro*

Metode yang digunakan dalam percobaan *in vitro* adalah metode eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor, terdiri dari 6 perlakuan yaitu kontrol negatif, kontrol positif serta perlakuan ekstrak kulit buah semangka dalam media PDA. Semua perlakuan diulang sebanyak 5 kali dan setiap unit percobaan terdiri dari 2 sampel, sehingga terdapat 60 sampel pengamatan. Data yang diperoleh dari kedua sampel pada setiap ulangan dirata-ratakan terlebih dahulu dan jika data tidak normal dan tidak homogen maka dilakukan transformasi data sebelum dianalisis menggunakan ANOVA. Perlakuan tersebut terdiri dari:

K- = tanpa ekstrak kulit buah semangka (kontrol negatif)

K+ = fungisida propineb (kontrol positif)

P1 = ekstrak kulit buah semangka 40%

P2 = ekstrak kulit buah semangka 20%

P3 = ekstrak kulit buah semangka 10%

P4 = ekstrak kulit buah semangka 5%

Model linier dari rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  = respon (nilai pengamatan)

$\mu$  = nilai tengah umum (rata-rata respon)

$T_i$  = pengaruh perlakuan ke-i ( $i = 1, 2, 3, 4, 5$ , dan 6)

$\varepsilon_{ij}$  = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j ( $j = 1, 2, 3, 4$ , dan 5)

Berdasarkan model linear tersebut, kemudian disusun tabel analisis sidik ragam (ANOVA) sebagaimana pada Tabel 1 dan Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 1. Sidik ragam rancangan acak lengkap untuk pengujian *in vitro*

| Sumber        | db | JK                    | KT            | Fhitung       | F tabel 5% |
|---------------|----|-----------------------|---------------|---------------|------------|
| Keragaman     |    |                       |               |               |            |
| Perlakuan (P) | 5  | $\Sigma t^2 / r - FK$ | $JK_P / db_P$ | $KT_P / KT_G$ | 2,26       |
| Galat (G)     | 24 | $JK_T - JK_P$         | $JK_G / db_G$ |               |            |
| Total (T)     | 29 | $\Sigma X^2 - FK$     |               |               |            |

Sumber: (Gomez & Gomez, 2007)

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

| Hasil Analisa               | Kesimpulan Analisa      | Keterangan                                        |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------|
| $F_{hit} \leq F_{tab 0,05}$ | Tidak berpengaruh nyata | Tidak terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan |
| $F_{hit} > F_{tab 0,05}$    | berpengaruh nyata       | Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan       |

Sumber: (Gomez & Gomez, 2007)

Jika hasil analisis keragaman menunjukkan perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = S_x \times SSR$$

Nilai  $S_x$  dapat dicari menggunakan rumus sebagai berikut:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan:

|          |                                         |
|----------|-----------------------------------------|
| LSR      | = <i>Least Significant Ranges</i>       |
| $S_x$    | = galat baku rata-rata                  |
| SSR      | = <i>Studentized Significant Ranges</i> |
| KT Galat | = kuadrat tengah galat                  |
| r        | = jumlah ulangan                        |

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Karakterisasi ekstrak kulit buah semangka

##### a. Ekstraksi kulit buah semangka

Proses dimulai dengan persiapan kulit buah semangka segar disortasi lalu dicuci bersih, diiris tipis dengan ketebalan 1 cm, dan dikeringkan di dalam oven dengan suhu 40-50 °C hingga kadar air menurun sampai  $\leq 10\%$  dan bahan menjadi kering. Setelah kering kulit buah semangka dihaluskan menjadi serbuk. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan pelarut dan kulit buah semangka 10:1 (v/b) selama  $3 \times 24$  jam pada suhu ruang. Filtrat yang diperoleh kemudian disaring dan dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 40-50 °C, hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian ekstrak disimpan dalam botol kaca gelap (Fauziah et al., 2025).

##### b. Skrining fitokimia ekstrak kulit buah semangka

Skrining fitokimia awal dilakukan di PT. Palapa Muda Perkasa, untuk mengetahui adanya senyawa bioaktif tanaman secara kualitatif menggunakan metode reaksi warna dan pengendapan berdasarkan prosedur metode Evans, (2009), yang meliputi identifikasi golongan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid dan fenolik, sebagai berikut:

##### - Uji alkaloid

1. Sebanyak 0,5 gr sampel ditimbang, kemudian ditambahkan larutan HCl2N dan air sebagai pelarut

2. Campuran sampel dipanaskan selama 5 menit lalu disaring untuk memisahkan filtrat. Setelah itu, filtrat dibagi tiga bagian untuk di uji menggunakan pereaksi *Dragendorff*, *Wagner*, dan *Mayer*
  3. Pada bagian pertama, filtrat ditambahkan 2-3 tetes pereaksi *Dragendorff*, sehingga hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat, jika tidak terbentuk endapan berwarna coklat maka hasilnya negatif
  4. Pada bagian kedua, filtrat ditambahkan dengan pereaksi *mayer*, sehingga hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih, jika tidak terbentuk endapan berwarna putih maka hasilnya negatif
  5. Pada bagian ketiga, filtrat ditambahkan dengan pereaksi *wagner*, sehingga hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah, jika tidak terbentuk endapan berwarna merah maka hasilnya negatif.
- Uji flavonoid
1. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 gr, kemudian ditambahkan 0,5 g serbuk Mg, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amilalkohol. Lalu campuran dikocok perlahan hingga homogen.
  2. Hasil uji dinyatakan positif apabila ditandai dengan timbulnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amilalkohol, jika tidak timbul warna tersebut maka hasil uji dinyatakan negatif.
- Uji saponin
1. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 gr dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml aquadest dan dipanaskan di *waterbath*
  2. Filtrat dikocok dengan kuat dan didiamkan selama 10 menit, sehingga hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil, jika tidak terbentuk busa maka hasilnya negatif.

- Uji tanin
  1. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 gr dan dimasukkan kedalam tabung reaksi.
  2. Sampel ditambahkan 5 ml aquadest lalu dipanaskan diatas *waterbath*
  3. Sampel didinginkan dan ditambahkan 2-3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1% dan gelatin 1%. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau, biru tua atau hitam kehijauan pada larutan, jika tidak terjadi perubahan warna tersebut maka hasilnya negatif.
- Uji steroid triterpenoid
  1. Sampel ditimbang 0,5 g, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan kloroform.
  2. Campuran sampel ditambahkan dengan pereaksi *Libermann-Burchard* yang terdiri dari  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan asam asetat glasial.
  3. Hasil uji menunjukkan adanya triterpenoid apabila terjadi perubahan warna ungu atau merah yang kemudian berubah menjadi ungu atau biru kehijauan, jika tidak ada perubahan warna dari ungu atau merah menjadi ungu atau biru maka hasil uji tidak menunjukkan adanya triterpenoid. Hasil positif steroid ditandai dengan perubahan warna biru atau hijau, jika tidak terjadi perubahan warna biru atau hijau maka hasilnya negatif steroid.
- Uji fenolik

Uji fenolik dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran, untuk mengetahui kandungan senyawa bioaktif fenolik pada ekstrak kulit buah semangka, dengan cara:

  1. Sampel diambil 0,1 g ekstrak kental kedalam tabung pereaksi, kemudian dilarutkan ke dalam 10 ml pelarut etanol
  2. Sampel ditambahkan dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  5%
  3. Apabila terjadi perubahan warna kehitaman menunjukkan positif keberadaan fenolik. Apabila tetap berwarna kuning menunjukkan negatif keberadaan fenolik

c. Uji antioksidan

Uji antioksidan dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran, untuk mengukur aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dalam ekstrak dengan analisis penentuan aktivitas antioksidan metode DPPH yaitu suatu metode uji spektrofotometri yang mengukur kemampuan senyawa atau ekstrak dalam meredam radikal bebas melalui perubahan warna larutan DPPH, dengan hasil utama berupa nilai  $IC_{50}$  atau TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (Gulcin & Alwasel, 2023).

3.4.2 Uji *in silico* ekstrak kulit buah semangka

a. Pencarian data senyawa kulit buah semangka

Analisis fitokimia ekstrak kulit buah semangka dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran dengan metode Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (GC-MS). Analisis GC-MS menggunakan GC-QP2010 (Shimadzu) yang dilengkapi dengan kolom kapiler silika lebur Omega Wax TM250 ID (30 m x 0,25 mm, dengan ketebalan film 0,25  $\mu$ m). Instrumen dikonfigurasi dengan suhu awal 100 °C dan suhu injeksi 270 °C, sedangkan laju alir kolom ditetapkan pada 1,21 ml/menit. Helium berfungsi sebagai gas pembawa pada laju alir 1 ml/menit dan kecepatan linier 35 cm/detik. Identifikasi semua senyawa dilakukan dengan membandingkan spektrum massa dan data indeks retensi terhadap komponen yang diketahui yang dirujuk dalam literatur dan basis data spektrum yang disimpan dalam pustaka GC-MS (Putri *et al.*, 2022). Hal ini dilakukan untuk mengetahui senyawa apa saja yang terkandung dalam kulit buah semangka yang akan dijadikan sumber senyawa kandidat untuk diuji lebih lanjut dengan metode *molecular docking*.

b. Kemiripan senyawa dengan pestisida

Prediksi kemiripan senyawa dengan pestisida merupakan tahap skrining awal pada *molecular docking* untuk menilai apakah suatu senyawa hasil dari proses GC-MS memiliki sifat fitokimia yang sesuai dengan kriteria Hao, agar berpotensi sebagai obat/ligan sebelum dilanjutkan ke uji *molecular docking*. Sebuah senyawa memenuhi aturan Hao apabila MW (*Molecular weight*)  $\leq 435$

dalton, HBA (*H-Bond Aceptors*)  $\leq 6$ , HBD (*H-Bond Donors*)  $\leq 2$ , cLogP (*Consensus Lipophilicity*)  $\leq 6$ , dan RotB (*Rotatable Bond*)  $\leq 9$ , (Avram *et al.*, 2014). Data senyawa terkait yang dibutuhkan, dapat dicari pada *website SwissADME* melalui <http://www.swissadme.ch/>, dengan memasukan string SMILES kanonik dan menekan "Run".

c. Prediksi toksisitas

Hasil senyawa-senyawa yang terpilih digunakan untuk analisis lebih lanjut untuk mengetahui toksisitas senyawa karsinogenik terhadap organ manusia yang bisa dianalisis dengan menggunakan *website ProTox 3.0 (Charite University of Medicine, Institute for Physiology, Jerman)* melalui <https://tox.charite.de/protox3/> dengan memasukkan string SMILES kanonik dan menekan "Start-Tox-Prediction", di mana model *machine learning* memperkirakan tingkat toksisitas untuk setiap parameter (Banerjee *et al.*, 2024). Untuk mengetahui toksisitas senyawa terhadap lingkungan bisa dianalisis dengan menggunakan *website cropCSM (The University of Queensland, The University of Melbourne, dan The Baker Heart & Diabetes Institute, Australia)* melalui [https://biosig.lab.uq.edu.au/crop\\_csm/](https://biosig.lab.uq.edu.au/crop_csm/) (Pires *et al.*, 2022). Data terkait senyawa kimia termasuk rumus kimia, struktur kimia, dan SMILES kanonik, diambil dari data PubChem (*National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Washington*) melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

d. *Molecular docking*

*Molecular docking* dilakukan menggunakan aplikasi PyRex dan BIOVIA Discovery Studio untuk menganalisis interaksi antara ligan dan protein, berikut tahapannya:

1. Preparasi struktur ligan

Preparasi struktur ligan yang merupakan senyawa dari ekstrak kulit buah semangka hasil GC-MS yang telah memenuhi aturan *Hao Rule of Five* diunduh struktur 3D nya dari *website PubChem* melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan format file sdf. Lalu format file dikonversi menjadi format file pdb dengan menggunakan Open Babel GUI agar bisa disiapkan di BIOVIA Discovery Studio.



## 2. Preparasi struktur protein target

Preparasi protein target dilakukan dengan pemodelan struktur 3D protein target dari *Fusarium oxysporum* yaitu cutinase dengan Uniprot ID X0BTD8 (Dimarogona *et al.*, 2015), pada website Uniprot melalui <https://www.uniprot.org/> dan mendownload sequence fasta yang akan dibutuhkan untuk pemodelan pada website *Swissmodel* melalui <https://swissmodel.expasy.org/>, dengan cara tekan "*Start Modelling*", masukan sequence fasta lalu tekan "*Search For Template*", lalu *download files* dan disiapkan di BIOVIA Discovery Studio.

## 3. Proses *docking* ligan dan protein target

Ligan dan protein target yang sudah dipreparasi dimasukkan ke dalam PyRx, kemudian area pengikatan ditentukan dengan membuat kotak grid yang mengelilingi situs target. Proses *docking* dijalankan menggunakan AutoDock Vina di PyRx. Setelah simulasi selesai, diperoleh hasil berupa skor *binding affinity* dan pose ligan yang membentuk kompleks dengan protein. Pose yang stabil dipilih berdasarkan nilai *binding affinity* paling negatif.

## 4. Visualisasi *docking*

Hasil *docking* diekspor ke BIOVIA Discovery Studio untuk dilakukan visualisasi dan analisis jenis-jenis interaksi, seperti ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Simpan hasil visualisasi sebagai file dan tangkap layar untuk dokumentasi.

### 3.4.3 Pembuatan media PDA

Pembuatan media *potato dextrose agar* (PDA) dilakukan dengan menimbang sebanyak 39 g media PDA untuk setiap liter larutan menggunakan neraca analitik. Serbuk media PDA tersebut kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan aquadest hingga mencapai 1 liter volume. Selanjutnya, larutan media dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* agar larut secara merata. Setelah media tercampur dan larut sempurna, larutan dibiarkan hingga suhunya menurun, yaitu sekitar 37 °C. Erlenmeyer yang telah berisi media ditutup menggunakan kapas, kemudian dilapisi dengan kasa dan kertas untuk mencegah kontaminasi

selama proses sterilisasi. Selanjutnya, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 2 atmosfer. Setelah proses sterilisasi selesai, media dituangkan ke dalam cawan petri dalam kondisi aseptik sebanyak 9 ml per cawan petri.

#### 3.4.4 Peremajaan isolat jamur *Fusarium oxysporum*

Isolat *Fusarium oxysporum* diperoleh dari tanaman kelor yang terserang penyakit layu fusarium dari koleksi Laboratorium Perlindungan Tanaman Universitas Siliwangi. Isolat yang terkumpul diremajakan dengan cara dikultur ulang pada cawan petri yang berisi 9 ml media PDA selama 7 hari setelah inokulasi (Tilahun *et al.*, 2024). Isolat yang telah diremajakan kemudian digunakan untuk percobaan *in vitro*.

#### 3.4.5 Uji *in vitro* ekstrak kulit buah semangka

Pengujian secara *in vitro* dilakukan untuk mengetahui efektivitas ekstrak kulit semangka dalam menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* yang merupakan patogen penyebab penyakit layu. Pengujian ini mengacu pada metode yang digunakan oleh Suganda *et al.*, (2023), yaitu metode uji daya hambat terhadap diameter koloni dengan menggunakan teknik peracunan makan atau *food poisoning*, di mana ekstrak kulit buah semangka dicampurkan langsung ke dalam media PDA steril dengan konsentrasi sesuai perlakuan.

Ekstrak kulit buah semangka yang telah diperoleh dilakukan pengenceran sesuai konsentrasi yang digunakan yaitu 40%, 20%, 10%, dan 5% dengan menyiapkan larutan stok 400 mg/ml, lalu mengencerkan larutan stok tersebut ke konsentrasi lebih rendah yaitu dengan 5 ml larutan stok dengan 5 ml pelarut untuk konsentrasi 200 mg/ml, 2,5 ml larutan stok dengan 7,5 ml pelarut untuk konsentrasi 100 mg/ml, dan 1,25 ml larutan stok dengan 8,75 ml pelarut untuk konsentrasi 50 mg/ml. Kemudian setiap masing-masing konsentrasi ekstrak sebanyak 0,5 ml dicampurkan dengan PDA 9 ml di cawan petri steril lalu digoyangkan hingga homogen dan biarkan media hingga padat dan siap untuk diinokulasi.

Untuk kontrol positif menggunakan fungisida propineb sebanyak 0,5 ml dan dicampurkan dengan PDA 9 ml di cawan petri hingga homogen, begitu juga dengan kontrol negatif hanya menggunakan aquades steril sebanyak 0,5 ml dan dicampurkan dengan PDA 9 ml di cawan petri tanpa penambahan ekstrak. Selanjutnya, dilakukan pemotongan inokulum *Fusarium oxysporum* dari kultur aktif menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm lalu ditempatkan di tengah media agar (Nugroho & Mildaryani, 2024). Pengukuran pertumbuhan koloni jamur dilakukan setiap hari selama 7 hari menggunakan jangka sorong digital, untuk melihat pengaruh ekstrak terhadap pertumbuhan diameter koloni *Fusarium oxysporum*.

### 3.5 Parameter Pengamatan

#### 3.5.1 Parameter penunjang

##### a. Karakteristik ekstrak kulit buah semangka

Pengujian karakteristik ekstrak diamati untuk menilai ekstrak kulit buah semangka yang dihasilkan. Karakteristik yang dinilai meliputi pH dan analisis GC-MS. Prosedur pengujian ekstrak diuraikan sebagai berikut:

- 1) Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan indikator pH universal. Ujung indikator multiwarna dicelupkan ke dalam ekstrak kulit buah semangka hingga terjadi perubahan warna. Selanjutnya, warna pada indikator dicocokkan dengan bagan warna yang tersedia dalam kemasan alat untuk mendapatkan pembacaan pH.
- 2) Analisis komposisi senyawa ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran dengan metode Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (GC-MS). Analisis GC-MS menggunakan GC-QP2010 (Shimadzu) yang dilengkapi dengan kolom kapiler silika lebur Omega Wax TM250 ID (30 m x 0,25 mm, dengan ketebalan film 0,25  $\mu$ m). Instrumen dikonfigurasi dengan suhu awal 100 °C dan suhu injeksi 270 °C, sedangkan laju alir kolom ditetapkan pada 1,21 ml/menit. Helium berfungsi sebagai gas pembawa pada laju alir satu ml/menit dan kecepatan linier 35 cm/detik. Identifikasi semua senyawa dilakukan dengan membandingkan spektrum massa dan data indeks

retensi terhadap komponen yang diketahui yang dirujuk dalam literatur dan basis data spektrum yang disimpan dalam pustaka GC-MS. Data komposisi senyawa yang diperoleh melalui analisis GC-MS disajikan secara deskriptif dalam format tabel dan grafik.

b. Pengamatan skrining fitokimia

Parameter yang diamati pada uji skrining fitokimia adalah perubahan warna atau pembentukan endapan setelah penambahan pereaksi spesifik pada ekstrak kulit buah semangka. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kualitatif, dimana hasil positif ditandai dengan (+) dan hasil negatif ditandai dengan (-).

c. Pengamatan uji antioksidan

Variabel yang diamati dalam pengujian ini meliputi nilai absorbansi dan nilai inhibisi senyawa dari ekstrak kulit buah semangka di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran. Dengan perhitungan berdasarkan Hidayati (2017) dengan rumus berikut:

$$Inhibisi = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100\%$$

Keterangan:

Ac = Absorbansi kontrol

As = Absorbansi sampel

### 3.5.2 Parameter utama

a. Pengamatan *in silico*

1) Kemiripan senyawa dengan pestisida

Karakteristik fitokimia senyawa dari hasil GC-MS ekstrak kulit buah semangka dievaluasi potensi kemiripannya dengan pestisida standar berdasarkan aturan Hao yang memprediksi kelayakan suatu molekul menjadi pestisida melalui penilaian yang mencakup 5 parameter utama yaitu berat molekul (MW) untuk mengukur ukuran partikel, koefisien partisi oktanol-air (LogP) yang merepresentasikan sifat hidrofobisitas, jumlah ikatan donor (HBD), jumlah akseptor ikatan hidrogen (HBA) untuk menilai kemampuan interaksi antarmolekul, serta jumlah ikatan yang dapat berotasi (RB) untuk

menentukan fleksibilitas bentuk struktur senyawa tersebut. Kelima parameter tersebut beserta acuan penilaiannya seperti pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3 Parameter kemiripan senyawa pestisida menurut Hao Rule's

| <i>Rule Class</i> | <i>Hao Pesticides</i> |
|-------------------|-----------------------|
| MW                | $\leq 435$            |
| LogP              | $\leq 6$              |
| HBD               | $\leq 2$              |
| HBA               | $\leq 6$              |
| RB                | $\leq 9$              |

Sumber: (Hao *et al.*, 2011)

## 2) Toksisitas senyawa

Prediksi toksisitas merupakan upaya untuk memperkirakan tingkat toksisitas suatu senyawa terhadap kesehatan manusia maupun lingkungan, termasuk dalam aktivitas herbisida. Parameter penilaian toksisitas pada manusia dapat dilakukan melalui beberapa aspek, antara lain toksisitas organ (*hepatotoksitas, neurotoksisitas, nefrotoksitas, toksisitas pernapasan, dan kardiotoxsisitas*), toksisitas titik akhir atau karsinogenisitas, serta nilai letal dosis (LD50). Kriteria LD50 diklasifikasikan berdasarkan *Globally Harmonized System* (GHS) ke dalam enam kelas, dengan ambang batas 5, 50, 300, 2000, dan 5000 mg/kg bobot tubuh, seperti pada Tabel 4.

Tabel 4 Klasifikasi toksisitas berdasarkan LD50

| Kelas | Keterangan                          | LD50 (mg/kg)    |
|-------|-------------------------------------|-----------------|
| I     | Sangat beracun, fatal jika tertelan | $\leq 5$        |
| II    | Fatal jika tertelan                 | $> 5 - 50$      |
| III   | Beracun jika tertelan               | $> 50 - 300$    |
| IV    | Berbahaya jika tertelan             | $> 300 - 2000$  |
| V     | Mungkin berbahaya jika tertelan     | $> 2000 - 5000$ |
| VI    | Tidak beracun                       | $> 5000$        |

Sumber : (Nafisa *et al.*, 2023).

## 3) *Binding affinity*

Nilai skor energi bebas berikatan ( $\Delta G$  bind) digunakan untuk mengevaluasi kekuatan interaksi antara ligan dan reseptor target. Ruswanto *et al.*, (2018) menyatakan bahwa semakin kecil hasil nilai skor dari suatu senyawa ligan uji

dengan makromolekul reseptornya maka kompleks ligan dan reseptor tersebut akan semakin stabil dan reaksinya terjadi secara spontan.

Tabel 5 Ketentuan skor energi bebas berikatan ( $\Delta G_{bind}$ )

| No | Skoring ( $\Delta G_{bind}$ ) | Keterangan hasil                       |
|----|-------------------------------|----------------------------------------|
| 1  | $\Delta G < 0$                | Reaksi akan berlangsung secara spontan |
| 2  | $\Delta G = 0$                | Reaksi akan berjalan <i>reversible</i> |
| 3  | $\Delta G > 0$                | Reaksi tidak berjalan                  |

Sumber: (Ruswanto *et al.*, 2018).

b. Pengamatan *in vitro*

1) Diameter koloni

Variabel yang diamati dalam pengujian ini adalah diameter koloni jamur *Fusarium* sp. Diameter koloni jamur diukur dengan jangka sorong digital, dan pengukuran ini dilakukan setiap hari selama 7 hari. Diameter diukur sebanyak 4 sisi diameter (Nugroho & Mildaryani, 2024), seperti rumus berikut:

$$D = \frac{d1+d2+d3+d4}{4}$$

Keterangan:

D = diameter pertumbuhan (mm)

d1 = diameter pertumbuhan sisi pertama (mm)

d2 = diameter pertumbuhan sisi ke dua (mm)

d3 = diameter pertumbuhan sisi ke tiga (mm)

d4 = diameter pertumbuhan sisi ke empat (mm)

2) Daya hambat

Pengukuran daya hambat dilakukan berdasarkan Nugroho & Mildaryani, (2024) dengan mengukur diameter koloni menggunakan jangka sorong digital. Perhitungan persentase daya hambat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Daya hambat} = \frac{dk-dp}{dk} \times 100\%$$

Keterangan:

dk = diameter koloni kontrol negatif (mm)

dp = diameter koloni perlakuan (mm)