

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Nanoteknologi telah mengalami perkembangan luar biasa dalam beberapa dekade terakhir, ditandai dengan peningkatan 25 kali lipat jumlah produk yang mengandung atau memerlukan nanopartikel (Ningsih et al., 2017). Nanoteknologi merupakan cabang teknologi yang terdiri dari sintesis, rekayasa, dan pemanfaatan bahan yang berukuran nano yang dikenal dengan nanomaterial (Paramita, 2024). Perkembangan nanomaterial didukung oleh berbagai keunggulan seperti ukuran partikel yang kecil, sifat khas yang berbeda dibandingkan partikel berukuran lebih besar serta fleksibilitasnya untuk dikombinasikan dengan teknologi lain (Altammar, 2023). Salah satu bagian yang sangat penting dalam nanoteknologi adalah penggunaan nanopartikel. Secara umum, nanopartikel dapat diartikan sebagai suatu partikel dengan ukuran nanometer yaitu sekitar 1-100 nm (Zulaicha et al., 2021).

Nanoteknologi telah menjadi salah satu disiplin ilmu paling inovatif di abad ke-21 karena kemampuannya mengendalikan materi pada skala nanometer (1–100 nm) sehingga menghasilkan material dengan sifat fisik, kimia, dan biologis yang berbeda secara signifikan dari material makroskopik, terutama akibat luas permukaan yang sangat besar terhadap volume dan efek kuantum yang dominan pada skala tersebut (Eker et al., 2024). Nanopartikel, sebagai salah satu bentuk nanomaterial inti, memiliki keunikan seperti aktivitas katalitik tinggi, modifikasi sifat optik dan elektronik, serta kemampuan penetrasi biologis yang membuatnya unggul untuk aplikasi di berbagai bidang seperti sensor, energi, dan lingkungan (Gund & Dodtale, 2024). Sintesis nanopartikel melibatkan berbagai pendekatan termasuk metode fisik, kimia, dan biologis/green synthesis, yang membantu mengendalikan ukuran, bentuk, serta distribusi partikel untuk mengoptimalkan performa fungsionalnya dalam aplikasi tertentu (Kumari et al., 2023).

Nanopartikel mangan dioksida (MnO_2) adalah salah satu nanomaterial logam oksida yang menarik perhatian dalam penelitian material dan nanoteknologi karena memiliki luas permukaan yang tinggi, struktur kristal beragam, serta aktivitas redoks dan katalitik yang unggul, sehingga mendukung berbagai aplikasi fungsional (Nguyen et al., 2023). Nanopartikel MnO_2 telah diterapkan secara luas dalam penyimpanan energi, seperti superkapasitor dan baterai, karena kemampuan redoksnya yang stabil dan kapasitas spesifik yang tinggi, serta dalam katalisis dan pengolahan lingkungan, termasuk degradasi polutan organik dan adsorpsi ion logam berbahaya (Jaganyi et al., 2023). Selain itu, nanostruktur MnO_2 juga digunakan dalam sensor elektroanalitik dan perangkat deteksi, menunjukkan fleksibilitas aplikasinya di bidang biomedis dan teknologi lingkungan, sekaligus menjadi fokus penelitian untuk pengembangan material nano fungsional yang aman, stabil, dan efektif (Zhang et al., 2019).

Sintesis nanopartikel dapat dilakukan dengan dua metode yang banyak digunakan dalam penelitian nanoteknologi, yaitu metode *top-down* dan *bottom-up*. Pendekatan *top-down* melibatkan pengurangan ukuran material besar atau *bulk* menjadi partikel berukuran nano melalui teknik fisik atau mekanik seperti penggilingan mekanik, ablasi laser, atau litografi, yang biasanya sederhana dan cocok untuk produksi skala besar meskipun terkadang menghasilkan partikel dengan distribusi ukuran kurang homogen serta cacat permukaan tertentu (Abid et al., 2022). Berdasarkan komposisinya terdapat dua jenis reduktor, yakni reduktor sintetis dan bioreduktor (reduktor yang berasal dari bahan alam). Kekurangan dari penggunaan reduktor sintetis pada proses sintesis nanopartikel perak yakni dapat menimbulkan adanya limbah berbahaya. Berbeda dengan penggunaan reduktor sintetis, penggunaan bioreduktor lebih ramah lingkungan jika dibandingkan dengan reduktor sintetis. Hal ini disebabkan penggunaan bioreduktor dalam proses sintesis nanopartikel perak tidak menghasilkan limbah yang berbahaya (Oktavia dan Sutoyo, 2021).

Teknik bioreduksi nanopartikel merupakan salah satu metode *bottom-up* yang memanfaatkan agen biologis seperti ekstrak tumbuhan, mikroorganisme (bakteri, jamur, alga), atau enzim untuk mereduksi ion logam menjadi nanopartikel logam atau logam oksida dengan ukuran nano (Nguyen et al., 2023). Metode ini sering disebut sebagai *green synthesis*, karena selain ramah lingkungan, proses ini tidak memerlukan bahan kimia berbahaya dan berlangsung pada kondisi reaksi yang relatif ringan, seperti suhu dan tekanan rendah (Samuel et al., 2022). Agen biologis bertindak ganda sebagai pereduksi dan penstabil, sehingga nanopartikel yang dihasilkan memiliki ukuran dan morfologi yang lebih terkendali, permukaan yang aktif, serta biokompatibilitas yang tinggi (Iravani et al., 2014). Teknik bioreduksi telah diaplikasikan untuk sintesis nanopartikel logam seperti Ag, Au, ZnO, dan MnO₂, yang menunjukkan aktivitas katalitik, antibakteri, dan sifat optik/elektrokimia yang unggul (Bukhari et al., 2021). Sintesis MnO₂ nanopartikel dapat dilakukan melalui berbagai metode, termasuk kimia konvensional, hidrotermal, sol-gel, dan *green synthesis* menggunakan ekstrak tanaman, yang memengaruhi ukuran partikel, morfologi, fase kristal, dan sifat permukaan sehingga menentukan performa material dalam aplikasi spesifik (Fahim et al., 2024).

Sintesis MnO₂ nanopartikel dapat dilakukan melalui berbagai metode, termasuk kimia konvensional, hidrotermal, sol-gel, dan *green synthesis* menggunakan ekstrak tanaman, yang memengaruhi ukuran partikel, morfologi, fase kristal, dan sifat permukaan sehingga menentukan performa material dalam aplikasi spesifik (Silva et al., 2024). Berbagai jenis tumbuhan mengandung senyawa kimia tertentu yang dapat berperan sebagai agen pereduksi. Kartik et al. (2024), telah mensintesis nanopartikel MnO₂ dari ekstrak air daun *Psidium guajava*. Pole et al (2025), telah mensintesis nanopartikel MnO₂ dari ekstrak daun *Justicia adhatoda*. Thangapushbam et al (2024), telah mensintesis nanopartikel MnO₂ dari ekstrak daun *Martynia annua*. Ekstrak yang digunakan mengandung senyawa

antioksidan dan sejumlah metabolit sekunder sehingga ekstrak tersebut dapat berperan sebagai bioreduktor untuk menghasilkan nanopartikel MnO_2 .

Indonesia memiliki kekayaan sumber daya alam dan keanekaragaman hayati yang melimpah, sehingga menawarkan peluang besar untuk penelitian, termasuk dalam pemanfaatan tumbuhan sebagai agen biosintesis nanopartikel. Pemanfaatan ekstrak tumbuhan ini berkaitan dengan keberadaan metabolit sekunder yang memiliki sifat antioksidan. Berbagai tanaman mengandung senyawa bioaktif yang dapat berfungsi sebagai agen pereduksi dalam pembentukan nanopartikel. Aktivitas antioksidan tersebut menjadikan tumbuhan sebagai alternatif yang ramah lingkungan (*green synthesis*) dalam produksi nanopartikel, karena dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sintetis yang berpotensi berbahaya (Suryanarayanan et al., 2015).

Salah satu tumbuhan tropis yang banyak dimanfaatkan adalah daun ketapang (*Terminalia catappa*). Jenis tanaman ini umumnya tumbuh di dataran rendah, dataran tinggi, hutan pantai, hutan rawa, dan sungai. Beberapa golongan senyawa kimia yang terkandung dalam daun ketapang adalah terpenoid, alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, dan tanin (Mirsyah et al., 2022). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Salimi et al. (2022) menyatakan bahwa golongan metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak air daun ketapang berupa flavonoid, saponin, tanin, dan steroid. Hal ini diperkuat dengan adanya penelitian yang dilakukan oleh Lembang et al. (2023) bahwa daun ketapang tua dan kering positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan steroid). Payapo et al. (2017) dalam penelitiannya berhasil mensintesis nanopartikel Ag dengan menggunakan ekstrak daun ketapang dengan ukuran partikel sebesar 96 nm.

Flavonoid pada daun ketapang memiliki gugus hidroksil aromatik yang mampu mendonorkan elektron dalam reaksi redoks. Tanin sebagai polifenol kompleks juga berperan sebagai agen pengkelat ion logam melalui ikatan koordinasi dengan gugus $-\text{OH}$ dan $-\text{COOH}$. Kehadiran asam fenolat seperti asam galat dan asam ellagik menambah sifat antioksidan kuat pada ekstrak (Ningsih et al., 2023). Senyawa-senyawa tersebut mampu mereduksi ion Mn^{2+} menjadi MnO_2 dalam proses sintesis nanopartikel berbasis metode hijau. Senyawa aktif, ekstrak daun ketapang sangat potensial dimanfaatkan tidak hanya sebagai agen obat tradisional, tetapi juga sebagai bahan pendukung sintesis nanomaterial. Selain bertindak sebagai agen pereduksi, biomolekul pada daun ketapang juga berfungsi sebagai yang menstabilkan partikel nano agar tidak mudah menggumpal (Mwangi et al., 2024). Mekanisme ini sangat penting karena ukuran partikel nano sangat menentukan sifat katalitik dan antibakterinya. Aktivitas antibakteri ekstrak daun ketapang sendiri sudah banyak dilaporkan, terutama terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Efek antibakteri tersebut berasal dari kemampuan senyawa polifenol mengganggu permeabilitas membran dan menginaktivasi protein bakteri (Zai et al., 2025).

Pengaruh buffer basa pada sintesis nanopartikel sangat signifikan karena pH larutan memengaruhi kinetika reduksi ion prekursor, ukuran, morfologi, dan stabilitas

nanopartikel. Penambahan dengan buffer, kinetika pertumbuhan kristal MnO_2 menjadi lebih terkontrol sehingga ukuran partikel lebih seragam. Interaksi antara gugus $-\text{OH}$ atau $-\text{COOH}$ dari ekstrak dengan permukaan nanopartikel lebih terstabilkan oleh muatan permukaan yang konsisten (Ahmad et al., 2023). Medium basa cenderung mempercepat reduksi ion logam serta meningkatkan ionisasi gugus stabilisator, sehingga menghasilkan nanopartikel dengan ukuran dan distribusi yang berbeda dibandingkan pH netral atau asam. Selain itu, buffer tidak hanya menjaga pH, tetapi juga dapat bertindak sebagai agen reduksi dan penstabil, memengaruhi bentuk dan monodispersitas nanopartikel (Velgosova et al., 2025). Studi stabilitas menunjukkan bahwa pH dan komposisi buffer memengaruhi interaksi ion pada permukaan nanopartikel, yang berdampak pada agregasi dan karakteristik akhir partikel. Pengaturan pH menjadi kunci dalam menentukan jalur reaksi redoks ion mangan (Elouardy, 2025). Pada suasana basa, ion Mn^{2+} cenderung teroksidasi menjadi $\text{Mn}(\text{OH})_2$ yang kemudian mengalami disproporsionasi membentuk MnO_2 . Kondisi basa juga mendorong stabilisasi fase $\delta\text{-MnO}_2$ yang memiliki luas permukaan lebih besar dibanding fase lainnya. Hal ini penting karena luas permukaan menentukan jumlah situs aktif yang dapat berinteraksi dengan biomolekul maupun bakteri. Buffer basa menjaga agar pH larutan tetap konstan selama reaksi berlangsung. Tanpa buffer, pH mudah berubah akibat pelepasan ion H^+ dari biomolekul ekstrak, yang dapat menyebabkan terbentuknya fase oksida mangan campuran (Nori et al., 2025).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk menyintesis Nanopartikel MnO_2 , seperti yang dilakukan Joshi et al. (2021) yang berhasil mensintesis Nanopartikel MnO_2 menggunakan ekstrak daun kecubung dan menghasilkan partikel dengan ukuran 20–50 nm. Uji antibakteri menunjukkan zona hambat 22 mm terhadap *Staphylococcus aureus* dan 16 mm terhadap *Escherichia coli*. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Fuada, H. (2025) Nanopartikel MnO_2 berhasil disintesis menggunakan ekstrak air daun ketapang sebagai agen pereduksi pada suasana basa, menghasilkan partikel dengan ukuran rata-rata 153 nm.

Berdasarkan latar belakang ini, maka penelitian difokuskan untuk mensintesis nanopartikel MnO_2 dengan menggunakan ekstrak air daun ketapang. Beberapa hasil yang diharapkan yaitu, mengetahui potensi buffer basa pada sintesis dan mengetahui bioaktivitas bakteri menggunakan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* pada MnO_2 hasil sintesis. Karakterisasi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan PSA, SEM-EDX dan FTIR.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah adalah sebagai berikut:

1. apakah sintesis nanopartikel MnO_2 dengan bioreduktor ekstrak air daun Ketapang dengan buffer pH basa dapat dilakukan?
2. bagaimana data karakterisasi nanopartikel MnO_2 hasil reduksi dari KMnO_4 dengan ekstrak air daun ketapang?
3. bagaimana hasil sintesis nanopartikel MnO_2 yang diuji aktivitasnya sebagai antibakteri?

1.3 Maksud Penelitian

1. menyintesis nanopartikel MnO_2 dengan bioreduktor ekstrak air daun Ketapang pada buffer pH basa dengan berbagai varian.
2. mengkarakterisasi nanopartikel MnO_2 dengan bioreduktor hasil ekstrak daun Ketapang pada buffer pH basa.
3. menguji sifat antibakteri nanopartikel MnO_2 dengan bioreduktor hasil ekstrak daun Ketapang pada buffer pH basa.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini ialah:

1. menghasilkan nanopartikel MnO_2 dengan bioreduktor ekstrak air daun ketapang pada buffer pH basa potensi.
2. menghasilkan data karakterisasi nanopartikel MnO_2 hasil reduksi dari KMnO_4 dengan ekstrak air daun ketapang.
3. menghasilkan data uji aktivitas antibakteri hasil sintesis nanopartikel MnO_2 .

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terbaru terhadap dunia pengetahuan dan penelitian mengenai pengaruh buffer basa pada sintesis nanopartikel MnO_2 dan uji aktivitas antibakterinya, khususnya bakteri yang mudah resisten seperti *E. coli* dan *S. aureus*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ketapang, KmnO_4 (*Merck*), etanol teknis, NH_4OH (*Merck*), NH_4Cl (*Merck*), akuades, akuabides, FeCl_3 (*Merck*), reagen Dragendorff, reagen Lieberman-Burchard, asetilaseton (*Merck*), *tissue roll*, kertas label, dan kertas saring *Whattman* No. 42.

2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas yang umum digunakan di laboratorium, blender, *hand pH-meter*, *magnetic bar*, *stirrer*, *oven*, tabung sentrifus, sentrifugasi, spektrofotometer UV-VIS (T60), alat FTIR (Shimadzu-IRPrestige21), SEM-EDX (JEOL Neoscope JCM-6000Plus Benchtop), dan PSA (Horiba SZ-100).

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan akhir Juli sampai November 2025 di Laboratorium Kimia Fisika Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, Laboratorium Penelitian dan Pengembangan SAINS Fakultas MIPA Universitas Universitas Hasanuddin, dan Laboratorium Mikrostruktur Fakultas Teknik Universitas Muslim Indonesia.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel

Daun ketapang dicuci menggunakan akuades dan dikeringkan pada suhu ruang. Daun kering dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan blender. Bubuk daun ketapang ditimbang sebanyak sebanyak 6 g ke dalam gelas kimia 250 mL, lalu dilarutkan dengan 200 mL akuabides dan distirer pada suhu 60°C selama 1 jam. Setelah itu, ekstrak air daun ketapang yang diperoleh didinginkan pada suhu ruang dan disaring (Lu et al., 2021).

2.4.2 Uji Fitokimia

Tanin. Ekstrak air daun ketapang dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ekstrak tersebut ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 10%. Uji positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna hitam kehijauan atau biru kehitaman (Sulistyoningdyah dan Ramayani, 2017).

Flavonoid. Ekstrak air daun ketapang dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan beberapa tetes NaOH 10%. Uji positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning kecoklatan (Kurnianto et al., 2023).

Saponin. Ekstrak air daun ketapang dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ekstrak tersebut ditambahkan beberapa tetes akuades dan dikocok hingga terbentuk buih stabil (Sulistyoningdyah dan Ramayani, 2017).

Steroid. Ekstrak air daun letapang dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,1 mL reagen Lieberman-Burchard. Uji positif ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau biru (Abriyani et al., 2021).

Terpenoid. Ekstrak air daun ketapang dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,1 mL reagen Lieberman-Burchard. Uji positif ditandai dengan perubahan warna menjadi merah ungu (Abriyani et al., 2021).

Alkaloid. Ekstrak air daun ketapang dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes reagen Dragendorff. Uji positif ditandai dengan pembentukan endapan merah kecoklatan (Erildawati dan Zahrina, 2023).

2.4.3 Pembuatan Larutan KMnO_4 1 mM

Padatan KMnO_4 ditimbang sebanyak 0,0395 gram ke dalam gelas kimia 50 mL, kemudian dilarutkan dengan sedikit akuabides. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL, lalu dihipitkan dan dihomogenkan untuk membuat larutan KMnO_4 1 mM.

2.4.4 Pembuatan Larutan NH_4Cl 0,1 M

Padatan NH_4Cl ditimbang sebanyak 0,535 gram ke dalam gelas kimia 50 mL, kemudian dilarutkan dengan sedikit akuabides. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu dihipitkan dan dihomogenkan.

2.4.5 Pembuatan Larutan NH_4OH 0,1 M

Larutan ammonia pekat dipipet sebanyak 0,6757 mL ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuabides hingga tanda batas

2.4.6 Pembuatan Buffer Basa

pH 8. Dipipet Larutan amonium hidroksida 0,1 M sebanyak 1,064 mL ke dalam gelas kimia, kemudian di tambahkan amonium klorida sebanyak 18,936 mL, lalu pH diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes amonium hidroksida sampai diperoleh pH 8.

pH 9. Dipipet Larutan amonium hidroksida 0,1 M sebanyak 7,196 mL ke dalam gelas kimia, kemudian di tambahkan amonium klorida sebanyak 12,864 mL, lalu pH diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes amonium hidroksida sampai diperoleh pH 9.

pH 10. Dipipet Larutan amonium hidroksida 0,1 M sebanyak 16,97 mL ke dalam gelas kimia, kemudian di tambahkan amonium klorida sebanyak 3,03 mL, lalu pH diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes amonium hidroksida sampai diperoleh pH 10.

pH 11. Dipipet Larutan amonium hidroksida 0,1 M sebanyak 19,64 mL ke dalam gelas kimia, kemudian di tambahkan amonium klorida sebanyak 0,36 mL, lalu pH diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes amonium hidroksida sampai diperoleh pH 11.

2.4.7 Pengaruh Variasi pH Buffer

Larutan KMnO_4 (Konsentrasi dan komposisi optimum) dimasukkan ke dalam 4 erlenmeyer berbeda dan diatur pada pH 8; 9; 10 dan 11 masing-masing 1 mL lalu ditambahkan dengan 1 mL ekstrak air daun ketapang. Campuran dihomogenkan lalu dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis (Fuada, H, 2025).

2.4.8 Sintesis Nanopartikel MnO₂

Larutan KMnO₄ (konsentrasi, komposisi dan pH optimum) dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 1 mL ekstrak air daun ketapang. Campuran dihomogenkan lalu disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Endapan yang dihasilkan dicuci menggunakan etanol dan akuabides. Endapan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 90°C selama 4 jam (Joshi et al, 2020). Endapan dikarakterisasi dengan FTIR, SEM-EDX, PSA.

2.4.9 Uji Bioaktivitas Antibakteri

2.4.9.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan metode sterilisasi kering (*Dry Sterilization Method*) dengan menggunakan oven. Alat dimasukkan ke dalam oven, kemudian diatur pada suhu 180°C selama 7,5 menit dengan tujuan untuk membunuh atau menghilangkan agen yang menjadi penyebab kontaminasi pada kultur jaringan. Oven bekerja menggunakan proses konduksi panas dengan terlebih dahulu memanaskan permukaan bagian luar peralatan (Wulandari et al., 2021).

2.4.9.2 Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Sebanyak 15 g MHA dimasukkan ke dalam Erlenmayer, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 250 mL dan dipanaskan hingga homogen. Selanjutnya disterilkan didalam autoklaf selama 15 menit pada tekanan 2 atm dengan suhu 121°C. Setelah disterilkan, campuran dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL dan didiamkan selama beberapa menit pada suhu kamar hingga padat (Nurhayati et al., 2020).

2.4.9.3 Persiapan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* diremajakan terlebih dahulu dengan cara ditumbuhkan pada media *Muller Hinton Agar* miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolat bakteri kemudian disuspensikan menggunakan NaCl fisiologi 0,9% dan diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm hingga diperoleh nilai transmitan 25% T (Nurhayati et al., 2020).

2.4.9.4 Uji Bioaktivitas Antibakteri

Pengujian sifat antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan kertas cakram (*blank disc*). Suspensi dari masing-masing bakteri uji yang telah disiapkan kemudian disebar merata pada permukaan media *Muller Hinton Agar* padat menggunakan kapas apus (*cotton swab*). Setelah itu, cakram kosong yang telah direndam selama sekitar 15 menit dalam masing-masing sampel, kontrol positif (amoxilin), dan kontrol negatif (akuades) diletakkan secara aseptik di atas permukaan media menggunakan pinset steril. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, diamati dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong (Nurhayati et al., 2020).