

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ilmu pengetahuan dan teknologi mengalami perkembangan yang cukup pesat saat ini dipengaruhi oleh perkembangan nanoteknologi dan nanosains dari para ilmuwan secara global. Salah satu komponen kunci dari nanoteknologi adalah nanopartikel, yang telah diaplikasikan secara luas dalam berbagai bidang seperti medis, katalis, dan kosmetik (Aini dan Amaria, 2022). Nanopartikel merupakan partikel dengan ukuran antara 1 hingga 100 nanometer, dan menunjukkan karakteristik fisik serta kimia secara signifikan dibandingkan dengan material dalam ukuran makroskopik (*bulk*), akibat efek kuantum dan rasio luas permukaan terhadap volume yang tinggi (Masykuroh dan Puspasari, 2020).

Perkembangan nanoteknologi telah menjadi fokus utama bagi komunitas ilmiah dan peneliti di berbagai negara. Negara-negara seperti Amerika Serikat, Jepang, Australia, Kanada, serta sejumlah negara di Eropa dan Asia, termasuk Singapura, Tiongkok, dan Korea Selatan, secara aktif mendorong kemajuan teknologi ini. Di Indonesia, nanoteknologi masih berada pada tahap awal pengembangan, yang dipengaruhi oleh keterbatasan dana dan fasilitas penelitian. Pada dekade 2010 hingga 2020, penerapan nanoteknologi di sektor industri global mengalami pertumbuhan yang sangat pesat (Balfas et al., 2016). Sebagai pelopor dalam penelitian nanoteknologi, Jepang dan Amerika Serikat menunjukkan dominasi yang signifikan dalam pengembangan teknologi pada skala nanometer. Nanoteknologi sendiri didefinisikan sebagai kemampuan untuk mengendalikan dan merekayasa struktur material pada skala atomik dan molekuler, yakni dalam rentang 1 hingga 100 nanometer (Fahmi, 2021).

Nanoteknologi telah diterapkan secara luas di berbagai sektor. Dalam bidang medis, partikel nano berfungsi dalam deteksi sel kanker dan penghantaran obat secara terarah. Di industri tekstil, nanopartikel perak digunakan untuk mengurangi bau pada kaus kaki, sementara di industri kosmetik teknologi ini mendukung inovasi produk (Widjanarko, 2022). Di sektor pangan, nanoteknologi memungkinkan aplikasi zat gizi mikro dan senyawa bioaktif yang sebelumnya sulit digunakan karena rendahnya kelarutan serta ketidakstabilan sifat fisik dan kimianya selama proses produksi dan distribusi (Ningrum et al., 2023).

Sintesis nanopartikel merupakan bidang kajian yang saat ini mengalami perkembangan pesat, hal ini dikarenakan beragamnya aplikasi yang dimilikinya, antara lain dalam pertukaran ion, elektroda, serta penyimpanan energi, khususnya pada material oksida mangan. Oksida mangan termasuk dalam golongan material transisi yang banyak diteliti. Beberapa senyawa oksida mangan yang dikenal antara lain MnO dengan warna hijau terang, serta Mn_3O_4 , Mn_2O_3 , dan MnO_2 yang berwarna cokelat kehitaman, yang ditemukan secara alami di alam. Material mangan oksida dengan warna hitam kecoklatan biasanya hadir dalam bentuk butiran kristalin yang

baik dan lapisan. Kristal oksida mangan memiliki kemampuan untuk mengadsorpsi molekul serta berfungsi sebagai penukar kation yang efisien (Ningsih, 2015).

Sintesis nanopartikel mangan dioksida (MnO_2) dapat dilakukan menggunakan kalium permanganat (KMnO_4) sebagai prekursor. Kalium permanganat banyak digunakan karena bersifat oksidator kuat dan berperan sebagai akseptor elektron dalam reaksi redoks, sehingga menghasilkan berbagai nanomaterial oksida mangan. Selain itu, KMnO_4 mampu menghasilkan MnO_2 dengan variasi struktur kristalografi dan luas permukaan yang besar, yang sangat dipengaruhi oleh kondisi reaksi, seperti pH dan sistem *buffer* yang digunakan (Ahmed, 2016). Penggunaan polimer PEG (polietilen glikol) sebagai surfaktan juga dilaporkan mampu mengontrol ukuran dan morfologi permukaan nanopartikel sehingga diperoleh partikel dengan distribusi ukuran yang lebih seragam.

Penggunaan *buffer* basa dalam sintesis nanopartikel MnO_2 memegang peranan penting dalam mengontrol kondisi reaksi, khususnya nilai pH yang memengaruhi mekanisme reduksi, nukleasi, dan pertumbuhan partikel. Pada kondisi basa, stabilitas ion mangan meningkat sehingga mempercepat pembentukan inti nanopartikel dan menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil serta distribusi yang lebih homogen. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sintesis MnO_2 pada pH tinggi mampu meningkatkan kestabilan struktur nano dan luas permukaan spesifik, yang berdampak pada peningkatan sifat fungsional material (Zhang et al., 2018).

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati yang tinggi dan memiliki ekosistem hutan hujan tropis yang luas. Keanekaragaman hayati ini membuka peluang besar dalam pemanfaatan sumber daya alam sebagai bahan baku ramah lingkungan. Salah satu tanaman yang berpotensi dimanfaatkan adalah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Daun mengkudu diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, senyawa fenolik, dan alkaloid yang memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Senyawa-senyawa tersebut berpotensi berperan sebagai agen pereduksi (bioreduktor) sekaligus penstabil (*capping agent*) dalam proses *green synthesis* nanopartikel (Wang et al., 2018).

Pemanfaatan ekstrak daun mengkudu dalam sintesis nanopartikel MnO_2 merupakan pendekatan *green synthesis* yang ramah lingkungan dan berkelanjutan. Senyawa bioaktif dalam ekstrak daun mengkudu dapat mereduksi ion permanganat menjadi MnO_2 sekaligus meningkatkan kestabilan nanopartikel yang terbentuk. Selain itu, keberadaan gugus fungsi alami dari senyawa flavonoid dan fenolik pada permukaan nanopartikel berpotensi meningkatkan interaksi dengan mikroorganisme.

Nanopartikel MnO_2 telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap berbagai bakteri patogen. Mekanisme antibakteri nanopartikel MnO_2 melibatkan interaksi langsung dengan dinding sel bakteri, gangguan permeabilitas membran sel, serta pembentukan spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species/ROS*) yang menyebabkan kerusakan protein, lipid, dan materi genetik sel bakteri. Aktivitas antibakteri ini dipengaruhi oleh ukuran partikel, morfologi, serta kondisi sintesis nanopartikel. Kombinasi antara MnO_2 nanopartikel dan senyawa bioaktif dari ekstrak daun mengkudu berpotensi menghasilkan efek antibakteri

sinergis terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Kumar et al., 2021).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji potensi ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) dalam pembentukan nanopartikel MnO_2 , menentukan karakteristik nanopartikel yang dihasilkan, serta mengevaluasi pengaruh *buffer* basa terhadap hasil sintesis dan aktivitas antibakteri nanopartikel MnO_2 .

1.2 Dasar Teori

1.2.1 Nanopartikel

Nanopartikel adalah partikel mikroskopis berukuran 1–100 nanometer yang memiliki sifat fisik dan kimia yang unik dibandingkan material dalam skala besar. Ukurannya yang kecil menyebabkan rasio luas permukaan terhadap volumenya menjadi tinggi, yang meningkatkan reaktivitas dan memengaruhi berbagai sifat seperti optik, listrik, dan magnet. Dalam aplikasi biomedis dan farmasi, nanopartikel sangat berpotensi karena dapat menembus jaringan sel dan membantu meningkatkan kelarutan serta efektivitas obat yang kurang larut dalam air (Abdassah, 2020).

Pembuatan nanopartikel dapat dilakukan melalui dua strategi utama, yaitu top-down, di mana material besar dihancurkan menjadi ukuran nano, dan bottom-up, yang menyusun nanopartikel dari skala atom atau molekul. Dalam praktik kimia, metode bottom-up sering melibatkan reaksi kimia menggunakan logam prekursor, agen reduksi, dan zat penstabil untuk mengontrol dimensi serta mencegah partikel saling menempel. Kondisi reaksi seperti suhu, tingkat keasaman (pH), dan konsentrasi bahan sangat memengaruhi sifat akhir nanopartikel, termasuk ukuran, bentuk, dan stabilitasnya. Proses karakterisasi nanopartikel meliputi analisis ukuran dan distribusi partikel, serta pengamatan bentuk morfologi dengan teknik seperti spektroskopi UV-Vis dan TEM (Fatihin, et al., 2016).

Nanopartikel memiliki peran yang sangat penting dalam berbagai bidang, terutama dalam kimia dan teknologi, misalnya sebagai katalisator reaksi, pembawa obat dalam sistem penghantaran, serta komponen utama dalam teknologi nano. Sifat khas yang dimiliki nanopartikel, yang tidak ditemukan pada material berukuran makro, menjadikannya sangat potensial untuk dikembangkan lebih lanjut, terutama dalam hal efisiensi reaksi kimia dan aplikasi biomedis. Di samping itu, penambahan bahan organik sebagai capping agent berfungsi untuk mengatur pertumbuhan dan kestabilan nanopartikel, memungkinkan pengendalian ukuran dan distribusi partikel sesuai kebutuhan fungsionalnya (Sephia et al., 2023).

1.2.2 Buffer Basa

Larutan *buffer* basa adalah larutan penyangga yang memiliki kemampuan mempertahankan nilai pH tetap stabil meskipun ditambahkan sejumlah kecil asam, basa, maupun mengalami pengenceran. Sifat penyangga ini membuat perubahan pH dapat diminimalkan sehingga kondisi larutan tetap terkontrol. Oleh karena itu,

larutan *buffer* basa banyak digunakan dalam berbagai bidang seperti industri, penelitian laboratorium, dan sistem biologis, mengingat kestabilan pH sangat berperan penting dalam menunjang berlangsungnya reaksi kimia secara optimal (Syafriani et al., 2024).

Larutan *buffer* basa biasanya disusun dari campuran antara basa lemah dan asam konjugasinya. Ketika sejumlah kecil asam kuat ditambahkan, basa lemah akan bereaksi dengannya untuk menetralkan perubahan pH, sehingga kestabilan pH tetap terjaga. Sebaliknya, saat basa kuat ditambahkan dalam jumlah kecil, asam konjugasi akan berperan dalam menetralkan basa tersebut, tetap menjaga kondisi pH larutan (Parastuti et al., 2016).

Konsep *buffer* basa secara fundamental berakar pada teori kesetimbangan kimia dan model Brønsted-Lowry yang menyatakan bahwa asam mendonorkan proton, sementara basa menerimanya. Larutan *buffer* basa terdiri dari pasangan basa lemah dan asam konjugasi yang berada dalam keseimbangan, memungkinkan larutan tersebut menahan perubahan pH saat terjadi penambahan sedikit asam atau basa. Pemahaman yang akurat terhadap konsep ini sangat penting, mengingat masih banyak terjadi miskonsepsi, seperti keyakinan bahwa campuran asam lemah dan basa non-konjugasi dapat berfungsi sebagai *buffer*, padahal kenyataannya tidak demikian. Selain itu, kemampuan sistem *buffer* dalam mempertahankan pH memiliki batas tertentu yang dikenal sebagai kapasitas *buffer*. Oleh karena itu, analisis kuantitatif melalui persamaan Henderson–Hasselbalch sering digunakan untuk memprediksi perubahan pH dalam larutan *buffer* basa (Riswana dan Rusmini, 2020).

1.2.3 Daun Mengkudu

Morinda citrifolia L., atau dikenal sebagai mengkudu, mengandung sejumlah senyawa aktif dalam daunnya yang berfungsi sebagai obat alami. Di antaranya adalah antrakuinon, flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, steroid, dan polifenol, yang menunjukkan sifat antimikroba, antijamur, dan antioksidan. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun mengkudu mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dan *Escherichia coli* secara signifikan (Simatupang, 2017). Selain itu, potensi antioksidan daun mengkudu telah diuji menggunakan metode DPPH, menghasilkan nilai IC₅₀ yang mendukung kemampuannya dalam melawan radikal bebas faktor yang berkontribusi terhadap berbagai penyakit degenerative (Irfayanti dan Hasan, 2023).

Ekstrak daun mengkudu menunjukkan efek terapeutik terhadap beberapa kondisi kesehatan, termasuk dalam menurunkan kadar glukosa darah serta mencegah komplikasi akibat diabetes. Efek ini diperoleh melalui aktivitas antioksidannya dan pengaruh positif terhadap parameter nefropati diabetik pada hewan percobaan. Temuan ini mengindikasikan potensi penggunaan daun mengkudu sebagai bahan alami dalam pengembangan terapi pendukung penyakit metabolik (Tandi et al, 2023).

Daun mengkudu dapat dikembangkan dalam bentuk sediaan topikal seperti krim tabir surya, dengan nilai SPF yang tinggi. Hal ini disebabkan oleh kandungan

senyawa fenolik dan flavonoid di dalamnya, yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan melindungi kulit dari kerusakan akibat paparan sinar matahari (Mugitasari dan Rahmawati, 2020).

1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti akan menarik rumusan masalah yang akan diambil pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. apakah nanopartikel MnO_2 dapat disintesis menggunakan ekstrak daun mengkudu sebagai bioreduktor dalam kondisi pH basa?

1.4 Maksud Penelitian

Adapun tujuan penelitian yang akan diambil pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. menyintesis nanopartikel MnO_2 menggunakan ekstrak daun mengkudu sebagai bioreduktor dalam kondisi pH basa, serta mengetahui karakteristik dan aktivitas antibakteri nanopartikel MnO_2 yang dihasilkan terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
- b. mengarakterisasi produk nanopartikel MnO_2 serta menguji kemampuan produk nanopartikel MnO_2 untuk menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

1.5 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian yang akan diambil pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. memperoleh nanopartikel MnO_2 dengan ekstrak daun mengkudu sebagai bioreduktor
- b. menghasilkan data karakter nanopartikel MnO_2 hasil sintesis
- c. menghasilkan data daya hambat nanopartikel MnO_2 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

1.6 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi mengenai pengaruh *buffer* basa pada sintesis karakterisasi nanopartikel MnO_2 dengan bioreduktor ekstrak daun mengkudu serta bagaimana ui aktifitasnya sebagai bahan antibakteri.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mengkudu, KMnO_4 (Merck), etanol (Merck), NaOH (Merck), HCl (Merck), akuades, akuabides, FeCl_3 (Merck), serbuk Mg, H_2SO_4 (Merck), CHCl_3 (Merck), anhidrida asetat (Merck), reagen Mayer, reagen Dragendorff, asetilaseton (Merck), NH_4OH (Merck), NH_4Cl (Merck), pH universal, tissue, kertas label, dan kertas saring Whatman no. 42.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, alat gelas umum yang digunakan di laboratorium, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, *magnetic bar*, oven, statif, klem, buret, hotplate, *centrifuge*, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), FTIR (*Fourier Transform Infrared*) (Shimadzu), SEM-EDX JEOL JED-2300 (*Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive X-Ray*), dan PSA (*Particle Size Analyzer*).

2.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Juli - November 2025 di Laboratorium Kimia Fisika Universitas Hasanuddin untuk melakukan preparasi sampel dan sintesis nanopartikel MnO_2 , Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin untuk uji gugus fungsi FTIR dan PSA, Laboratorium Mikrostruktur Fakultas Teknik Universitas Muslim Indonesia untuk analisis SEM-EDX, dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin untuk uji antibakteri.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel

Daun mengkudu diambil di belakang Gedung Rektorat Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan. Sampel daun mengkudu dicuci hingga bersih dengan akuabides kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Sampel kering dihaluskan hingga menjadi serbuk. Serbuk kering daun mengkudu ditimbang sebanyak 10 g, serbuk kemudian dimasukkan kedalam gelas kimia 250 mL kemudian ditambahkan 100 ml akuabides dan direbus hingga mendidih lalu didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 42. Kemudian ekstrak yang diperoleh disimpan di lemari pendingin untuk digunakan lebih lanjut (Dessie et al., 2020).

2.4.2 Uji Fitokimia

Uji Tanin. Ekstrak daun mengkudu 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).

Uji Flavonoid. Ekstrak daun mengkudu 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).

Uji Saponin. Ekstrak daun mengkudu 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).

Uji Steroid. Ekstrak daun mengkudu dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan 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 daun mengkudu 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 daun mengkudu dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes reagen Dragendorff. Uji positif ditandai dengan pembentukan endapan merah kecoklatan (Eridawati dan Zahrina, 2023).

2.4.3 Pembuatan Larutan KMnO_4

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

2.4.4 Pembuatan Larutan NH_4OH 0,1 M

Amonium hidroksida dipipet sebanyak 0,6757 mL ke dalam gelas kimia, kemudian di tambahkan akuades hingga mencapai 100 mL.

2.4.5 Pembuatan Larutan NH_4Cl 0,1 M

Padatan Amonium klorida ditimbang sebanyak 0,535 g menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades dan di aduk. Setelah itu, ditambahkan akuades hingga mencapai 100 mL.

2.4.6 Pembuatan Larutan *Buffer* Amonium 20 mL

pH 8. Larutan ammonium hidroksida 0,1 M dipipet sebanyak 1,064 mL ke dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan ammonium klorida sebanyak 18,936 mL, lalu pH diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes natrium asetat sampai diperoleh pH 8.

pH 9. Larutan ammonium hidroksida 0,1 M dipipet sebanyak 7,196 mL ke dalam gelas kimia, kemudian di tambahkan ammonium klorida sebanyak 12,804 mL, lalu pH diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes natrium asetat sampai diperoleh pH 9.

pH 10. Larutan ammonium hidroksida 0,1 M dipipet sebanyak 16,97 mL ke dalam gelas kimia, kemudian di tambahkan ammonium klorida sebanyak 3,03 mL, lalu pH

diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes natrium asetat sampai diperoleh pH 10.

pH 11. Larutan ammonium hidroksida 0,1 M dipipet sebanyak 19,64 mL ke dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan ammonium klorida sebanyak 0,36 mL, lalu pH diukur dengan menggunakan pH meter dengan menambahkan tetes demi tetes natrium asetat sampai diperoleh pH 11.

2.4.7 Optimasi Variasi *Buffer*

Larutan KMnO_4 (konsentrasi dan komposisi optimum) dipipet ke dalam 4 erlenmeyer berbeda, kemudian ditambahkan larutan buffer basa dengan pH 8;9;10 dan 11 masing-masing 1 ml, setelah itu ditambahkan 1 mL ekstrak daun mengkudu. Campuran dihomogenkan lalu dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis.

2.4.8 Sintesis Nanopartikel MnO_2

Larutan KMnO_4 dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 1 mL ekstrak air daun mengkudu dan ditambahkan 1 mL buffer basa pH optimum. 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. Nanopartikel MnO_2 dikalsinasi selama 2 jam pada suhu 300°C (Joshi et al., 2020). Endapan dikarakterisasi dengan FTIR, SEM-EDX dan PSA.

2.4.9 Uji Antibakteri

2.4.9.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan. Mulut tabung reaksi dan erlenmeyer disumbat dengan kapas dan kain kasa steril. Alat yang terbuat dari gelas disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat yang tidak tahan terhadap suhu tinggi dan berskala disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara pemijaran atas api bunsen hingga memijar (Widyanti dan Fatmawati, 2022).

2.4.9.2 Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)

Mueller Hinton Agar (MHA) dimasukkan sebanyak 7,6 g ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 200 mL dan dipanaskan sambil diaduk. Media MHA yang berada di dalam erlenmeyer disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Media MHA yang sudah steril dituang ke dalam tabung reaksi steril sampai seperempat tinggi tabung lalu dimiringkan dan didiamkan hingga memadat.

2.4.9.3 Persiapan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans* diremajakan dengan cant ditumbuhkan pada media Mueller Hinton Agar (MHA) miring lalu diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Isolat bakteri kemudian disuspensikan menggunakan NaCl fisiolog 0,9% dan diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm hingga diperoleh nilai transmittan 25% T (Fathoni et al., 2021).

2.4.9.4 Uji Bioaktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri nanopartikel MnO₂ terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans* ditetapkan berdasarkan metode difusi agar menggunakan kertas cakram (*blank disc*). Sebanyak 0,2 mL suspensi bakteri uji diinokulasikan ke dalam media MHA yang masih cair (suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$) kemudian dihomogenkan hingga merata. Campuran media dengan bakteri uji selanjutnya dituang ke dalam cawan petri sebanyak $\pm 15\text{ mL}$. Lalu dibiarkan hingga memadat. Sebanyak 5 *blank disc* dengan diameter 6 mm direndam ke dalam masing-masing 5 mL larutan nanopartikel MnO₂ 1%, KMnO₄ 1%, buffer asetat 1%, kontrol positif (ampisilin 1%) dan kontrol negatif (akuades) selama ± 15 menit. *Blank disc* yang telah direndam diinokulasi di atas permukaan media MHA yang telah memadat secara aseptis dan diberi jarak agar tidak *overlapping*. Media MHA yang berisi bakteri dan *blank disc* diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Diameter daerah hambat antibakteri diukur menggunakan jangka sorong setelah inkubasi selesai (Kosasi et al., 2019; Fatimah et al., 2022).