# BAB III METODE PERCOBAAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini meliputi pengumpulan bahan tumbuhan, pengolahan sampel, karakterisasi simplisia, pembuatan ekstrak,skrining fitokimia, pembuatan nanopartikel ekstrak daun pepaya *( Carica papaya* L.),karakterisasi nanopartikel menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*), serta uji aktivitas antibakteri terhadap *Cutibacterium acnes.*

## 3.1.1 Variabel Penelitian

Penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun pepaya 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% dan konsentrasi nanopartikel ekstrak etanol daun pepaya 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,312%, 0,156% dan 0,078% sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun pepaya dan nanopartikel ekstrak etanol daun pepaya terhadap bakteri *Cutibacterium acnes*. Kontrol negatifnya adalah Dimetilsulfoksida (DMSO) dan kontrol positifnya adalah clindamycin 25μg.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

* 1. Parameter karakteristik dari serbuk simplisia daun pepaya meliputi kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.
  2. Parameter skrining fitokimia metabolit sekunder dari serbuk dan ekstrak etanol daun pepaya meliputi adanya senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin dan steroid/ triterpenoid.
  3. Parameter karakteristik ekstrak etanol dan nanopartikel ekstrak etanol daun pepaya dengan menggunakan uji Particle Size Analyzer (PSA) adalah ukuran partikel dalam satuan nanometer (nm).
  4. Parameter aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun pepaya dan nanopartikel ekstrak etanol daun pepaya dengan menggunakan metode difusi cakram adalah diameter zona hambat untuk mengetahui aktivitas antibakteri terhadap *Cutibacterium acnes*.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-juni 2024

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

Pembuatan simplisia, ekstrak, dan karakterisasi simplisia dilakukan di Laboratorium Botani Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah. Uji skrining fitokimia dan pembuatan nanopartikel dilakukan di Laboratorium Penelitian Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah. Uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah. Pengujian Particle Size Analyzer (PSA) dilakukan di Laboratorium Nanomedisin Universitas Sumatera Utara.

## 3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya, etanol 96%, HCL 2N, FeCl3 1%, Kloralhidrat, Bouchardat, Dragendorff, Mayer, Kloroform, media Nutrient Agar (NA), media Mueller Hinton Agar (MHA), Mueller hinton broth (MHB), kertas cakram, DMSO (Dimetil Sulfoksida), larutan standard Mcfarland 0,5, NaCl steril 0,9%, H2SO4 1%, aquadest, bakteri *Cutibacterium acnes.*

## 3.4 Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rotary evaporator (DLAB), kertas saring, neraca analitik (Vibra), cawan porselin, kurs porselin, seperangkat alat penetapan kadar air, alat-alat gelas laboratorium, magnetic stirrer, homogenizer (IKA RW 20 digital), jangka sorong digital, alumunium foil, jarum ose, inkubator, autoklaf, oven, pipet tetes, blender, ayakan, toples kedap udara, Particle Size Analyzer (Fritsch), tabung reaksi, cawan petri, lampu spiritus.

## 3.5 Isolat Bakteri

Penelitian ini menggunakan sampel berupa isolat bakteri *Curibacterium acne* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi USU.

## 3.6 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya *(Carica papaya* L.) bagian yang diambil daun pepaya. Sampel daun pepaya yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari kawasan Medan Amplas Kota Medan.

### 3.6.1 Metode Pengumpulan Sampel

Pengambilan sampel daun pepaya menggunakan metode *purposive sampling* dengan kriteria inklusi daun yang masih segar dan daunnya berwarna hijau cerah. Yaitu mengambil tanaman dengan sengaja dari suatu tempat tanpa membandingkan dengan hasil dari daerah yang lain.

### 3.6.2 Identifikasi Sampel

Sampel daun pepaya yang digunakan pada penelitian ini dilakukan determinasi di Herbarium Medanense (MEDA) Laboratorium terpadu Universitas Sumatera Utara (USU).

### 3.6.3 Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis

Uji makroskopis dilakukan dengan menggunakan kaca pembesar atau tanpa alat. Metode ini digunakan untuk mencari , khususnya morfologi, ukuran, dan warna Simplisia, dan dilakukan pengujian terhadap sampel.

Uji Mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran derajat yang disesuaikan dengan kebutuhan .Simplisia yang diuji dapat berbentuk potongan melintang, radial, parademal, memanjang, atau berbentuk serbuk. Mikroskopik memeriksa elemen anatomi jaringan yang khas (Utami *et al.,* 2018).

### 3.6.4 Pengolahan Sampel

Bahan baku yang digunakan sebagai sampel adalah lembar daun pepaya. Daun pepaya dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan dipisahkan dari tangkai daun serta sisa kotoran atau benda asing. Lembar daun pepaya yang sudah disortir basah dan dibersihkan, dipotong kecil-kecil untuk memudahkan proses pengeringan. Daun pepaya kering. Proses pengeringan berlangsung beberapa hari hingga kadar air berkurang (Nugrahani *et al.*, 2020)

### 3.6.5 Karakteristik Simplisia

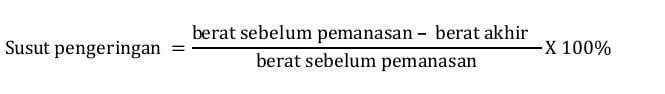
Identifikasi simplisia dilakukan dengan melakukan pengamatan simplisia baik secara makroskopik maupun secara mikroskopik penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu, penetapan kadar abu tidak larut dalam asam (Mayasari dan Laoli, 2018).

* + - 1. Penetapan Kadar Air

Kadar air diukur dengan metode azeotrop (distilasi toluena). Perangkat ini terdiri dari alas bundar 500 ml, reservoir, pendingin, tabung penghubung, dan tabung penerima 10 ml. Langkah pertama adalah saturasi dengan toluena. 2 ml toluena dan 2 ml toluena, total 200 ml. Isi labu alas bulat dengan air suling, pasang pendingin penahan dan suling selama 2 jam. Distilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, setelah itu jumlah air dalam tabung penerima dibaca hingga ketelitian 0,05 ml. Selanjutnya, 5 g bubuk simplisia yang ditimbang dengan hati-hati ditambahkan ke dalam labu dan dipanaskan perlahan selama 15 menit. Setelah toluena mendidih, sesuaikan kecepatan tetesan menjadi 2 tetes per detik hingga sebagian besar air tersuling, kemudian tingkatkan kecepatan distilasi menjadi 4 tetes per detik. Setelah semua air disuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena. Distilasi dilanjutkan selama 5 menit kemudian tabung penerima didinginkan hingga suhu kamar. Setelah air dan toluena benar-benar terpisah, baca jumlah air hingga ketelitian 0,05 ml. Perbedaan antara kedua pembacaan air tersebut sesuai dengan kadar air bahan yang diuji. Kadar air dihitung dalam persentase dengan menggunakan rumus sebagai berikut: (Anggraeni, 2020).

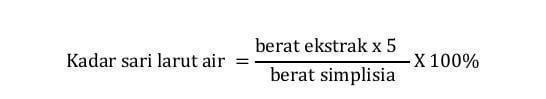
* + - 1. Penetapan Susut Pengeringan

Satu gram Simplisia ditimbang dengan hati-hati dan disimpan dalam wadah porselen bertutup, dipanaskan hingga 105 °C selama 30 menit. Simplisia dipipihkan dengan cara mengocok cawan sampai merata di dalam cawan porselen. Masukkan ke dalam oven, buka wadahnya, panaskan dengan suhu 100°C sampai 105°C, timbang, dan ulangi pemanasan hingga tercapai berat tertentu (Mayasari dan Laoli, 2018).



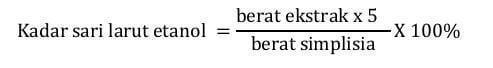
* + - 1. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 g serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml kloroform P (2,5 ml kloroform dalam 1000 ml air suling) menggunakan labu tertutup, sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Setelah penyaringan cepat, 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan beralas datar (tared) di atas penangas air, dan sisanya dipanaskan hingga 105 °C hingga berat konstan. Kandungan dihitung sebagai persentase bahan yang dikeringkan di udara (Mayasari dan Laoli, 2018).



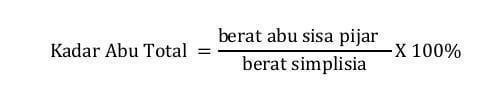
* + - 1. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Seperti dijelaskan dalam monografi, 5 g bubuk Simplisia dimaserasi dalam 100 ml etanol selama 24 jam, menggunakan labu tertutup selama 6 jam pertama, sesekali dikocok, dan kemudian didiamkan. 20 mL filtrat segera disaring dan diuapkan dalam gelas kimia dangkal (Mayasari dan Laoli, 2018).



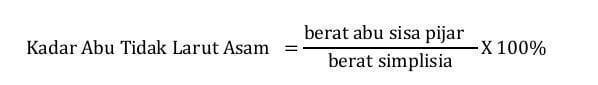
* + - 1. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 3 g serbuk simplisia yang telah dihaluskan dan ditimbang secara teliti dimasukkan ke dalam cawan porselin yang diaduk dan diratakan. Wadah dibakar secara perlahan hingga arang habis, dianil pada suhu 600 °C selama 3 jam, kemudian didinginkan hingga tercapai berat konstan dan ditimbang. Kadar abu dihitung pada bahan yang dikeringkan di udara. Jika tidak dapat dihilangkan dengan cara ini, tambahkan air panas dan saring melalui kertas saring bebas abu. Tempatkan sisa kertas dan kertas saring dalam wadah yang sama. Filtrat ditempatkan dalam wadah dan dibiarkan menguap. Digiling hingga tersisa beratnya, ditimbang dan dihitung (Mayasari dan Laoli, 2018)



* + - 1. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penentuan kadar abu direbus dalam 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui krus kaca pasir atau kertas saring tanpa abu yang diketahui beratnya, dan sisanya. difilter. Untuk melakukan. Dipanaskan, kemudian didinginkan dan ditimbang hingga beratnya tetap konstan. Kadar abu tidak larut asam dihitung untuk bahan yang dikeringkan di udara (Mayasari dan Laoli, 2018).



### 3.6.6 Pembuatan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Pada penelitian ini sampel ekstraksi daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang dilakukan sebanyak 500 gram, dimaserasi dengan 5000 mL pelarut etanol 96% dan dimaserasi selama 5x24 jam,perendaman pertama 75 Bagian (3750 mL Simplisia yang sudah larut disaring kemudian filtrate ditampung sebagai maserat I. Proses perendaman dilakukan kembali dengan etanol 96% sebanyak 1250 mL hingga diperoleh maserat II. Maserat I dan maserat II digabungkan, lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk memisahkan ekstrak dari pelarutnya maka diperoleh ekstrak pekat daun pepaya (Depkes RI, 1979).

## 3.7 Pembuatan Nanopartikel Dari Ekstrak Daun Pepaya *(Carica papaya* L.*)*

Реmbuatan nanopartikel ekstrak daun pepaya dibuat dengan teknik homogenizer tekanan tinggi (HSH) dengan metode *top down.* Dengan menimbang 35 g ekstrak kental daun pepaya,lalu dimasukkan dalam beaker 250 ml, kemudian di homogenizer 2000 rpm selama 2 jam. Setelah di homogenizer kemudian di ultrasonic cleaner selama 1 jam (Inguva et al, 2015).

### 3.7.1 Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Pepaya

#### 3.7.1.1 Distribusi Ukuran Partikel (PSA)

Nanopartikel ekstrak dam natos dikarakterisasi menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) untuk mengetahui ukuran partikel yang dihasilkan (Natasya, 2018). Pada karakterisasi ukuran partikel dengan PSA, specimen dilarutkan dalam 3 ml etanol. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung dengan ketinggian larutan maksimum 15 mm. Kemudian distribusi diameter spesimen diukur menggunakan VASCO Nano Particle Analyzer. Pemeriksaan ini dilakukan berdasarkan metode Dynamic Light Scattering (DLS) menggunakan Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

## 3.8 Pembuatan Larutan Pereaksi

### 3.8.1 Larutan pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml air suling, kemudian ditambahkan 2 g iodium sedikit demi sedikit dan ditempatkan volumenya hingga 100 ml dengan air suling (DEPKES RI, 1995).

### 3.8.2 Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dengan 60 ml air suling, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml (DEPKES RI, 1995).

**3.8.3 Larutan Pereaksi Dragendrof**

Sebanyak 8 g bismuth (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 ml asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium iodide lalu dilarutkan dalam 50 ml air suling. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (DEPKES RI, 1995).

### 3.8.4 Larutan pereaksi Molisch

Sebanyak 3 g alfa-naftol ditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga 100 ml (DEPKES RI, 1995).

### 3.8.5 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat diencerkan dalam air suling hingga 100 ml (DEPKES RI, 1995).

### 3.8.6 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2 N

Sebanyak 5,4 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (DEPKES RI, 1995).

### 3.8.7 Larutan Pereaksi Liebermann-Burchard

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrida dicampurkan dengan 1 bagian asam sulfat pekat (DEPKES RI, 1995).

### 3.8.8 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dengan air suling hingga 100 ml (DEPKES RI, 1995).

### 3.8.9 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat dilarutkan dalam air suling bebas karbondioksida hingga 100 ml (DEPKES RI, 1995).

## 3.9 Skrining Fitokimia

### 3.9.1 Pemeriksaan Alkaloida

Sampel uji ditimbang hingga 0,5 g, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji alkaloid, dikeluarkan tiga tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 ml filtrat. Reagen yang berbeda ditambahkan ke setiap tabung reaksi.

1. Tabung reaksi 1: Tambahkan 2 tetes reagen Mayer.
2. Tabung reaksi 2: ditambahkan 2 tetes reagen Bouchardat
3. Tabung reaksi 3: Jika muncul endapan atau kekeruhan

Pada setidaknya dua dari tiga percobaan di atas, ditambahkan dua tetes pereaksi alkaloid Dragendorff positif (Depkes RI,1989).

### 3.9.2 Pemeriksaan Flavonoida

Sebanyak 10 g sampel uji ditambahkan ke dalam 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, dan disaring selagi panas. 0,1 g bubuk magnesium, 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol ditambahkan ke dalam 5 ml filtrat, dikocok dan dipisahkan. Flavonoid bernilai positif jika warna lapisan amil alkoholnya merah, kuning, atau jingga (Depkes RI,1989).

### 3.9.3 Pemeriksaan Saponin

Sampel uji ditimbang hingga 0,5 g, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, didinginkan dengan menambahkan 10 ml air mendidih, dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk gelembung setinggi 1-10 cm, stabil minimal 10 menit, dan tidak hilang setelah ditambahkan setetes asam klorida 2N, hal ini menunjukkan adanya saponin (Depkes RI,1989).

### 3.9.4 Pemeriksaan Tanin

Sampel uji ditimbang sebanyak 1 g, dididihkan selama 3 menit dalam 100 ml air suling lalu didinginkan dan disaring larutan diambil 2 ml ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI,1989).

### 3.9.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 1 g sampel uji dimaserasi dalam 20 ml n-heksana selama 2 jam lalu disaring. Filtratnya diuapkan dalam gelas kimia evaporator. Tambahkan beberapa tetes reagen Lieberman-Burchard ke dalam sisanya. Kemunculan warna biru atau biru kehijauan menunjukkan adanya steroid, dan kenampakan merah, merah muda, atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Depkes RI,1989).

### 3.9.6 Pemeriksaan Glikosida

Uji reaksi Lieberman-Burchard dilakukan dengan menggunakan 1 g ekstrak dalam gelas porselen 5 ml. Anhidrida asetat P. Setelah ditambahkan 10 tetes P sulfat, muncul warna biru atau hijau yang menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI,1989).

## 3.10 Penyiapan Uji Aktivitas Antibakteri

### 3.10.1 Sterilisasi

Alat-alat yang akan digunakan sebelumnya dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan. Alat-alat yang tidak tahan panas dibungkus dengan kertas kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 1210C selama 15 menit. Sedangkan alat alat yang tahan pemanasan seperti pinset dan jarum ose disterilkan dalam oven pada suhu 1800C selama 2 jam (Sartini, 2016).

### 3.10.2 Sumber Isolat Bakteri

Isolat bakteri *Cutibacterium acnes* berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.

### 3.10.3 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Diitimbang sebanyak 0,56 gram dimasukkan dalam Erlenmeyer yang sesuai, kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 20 ml, lalu dikocok homogen. Dipanaskan dalam air hingga mendidih sambil dikocok sesekali selama 1 menit sampai larut sempurna. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 0C selama 15 menit (Sartini, 2016).

### 3.10.4 Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Diitimbang sebanyak 5,7 gram dimasukkan dalam Erlenmeyer yang sesuai, kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 150 ml, lalu dikocok homogen. Dipanaskan dalam air hingga mendidih sambil dikocok sesekali selama 1 menit sampai larut sempurna. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 0C selama 15 menit (Sartini, 2016).

### 3.10.5 Pembuatan Media Mueller Hinton Broth (MHB)

Sebanyak 1,2 gram media Mueller hinton broth (MHB) ditimbang, dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, dilarutkan dalam 60 mL aquades, kemudian dipanaskan hingga larut. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

### 3.10.6 Regenerasi Bakteri

Uji ini dilakukan pada cawan petri yang berisi media Nutrient Agar (NA). Masing-masing cawan petri digoresi dengan bakteri *C.acnes* dengan kawat ose steril secara merata ke permukaan NA Koloni dan dikultur pada suhu 37°C selama 24 jam hingga terjadi reaksi (Purwati *et al*., 2021).

### 3.10.7 Pembuatan Standar McFarland 0,5

Sebanyak 9,95 mL H2SO4 1% dan 0,05 mL BaCl2 1% dicampur dan dihomogenisasi hingga diperoleh larutan standar McFarland 0,5 (Ariani *et al.,* 2019).

### 3.10.8 Pembuatan Suspensi Bakteri

Beberapa koloni bakteri *Cutibacterium acnes* dikumpulkan menggunakan jarum steril dari subkultur yang diperoleh dari regenerasi bakteri selama 24 jam. Koloni bakteri disuspensikan dalam 10 ml larutan NaCl 0,9% steril, kemudian suspensi bakteri dihomogenisasi menggunakan vorteks. Kekeruhan suspensi bakteri dibandingkan dengan kekeruhan standar *Mc.Farland* sebesar 0,5. Kepadatan populasi sel suspensi kultur cair bakteri dengan kekeruhan setara *Mc.Farland* 0,5 adalah 1,5 × 108 CFU/ml (Ariani *et al.,* 2019).

## 3.11 Pengujian Aktivitas Antibakteri

### 3.11.1 Metode Difusi Cakram

Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan menggunakan metode cakram. Suspensi bakteri *Cutibacterium acnes* diambil menggunakan cotton bud steril. Cotton bud steril dimasukkan kedalam suspensi bakteri dengan diperas di pinggir tabung. Kemudian cotton bud di goreskan ke media Mueller Hinton Agar (MHA). Lalu letakkan kertas cakram menggunakan pinset, dan teteskan zat uji keatas kertas cakram menggunakan mikropipet. Dan letakkan juga kontrol positif (clindamycin ) menggunakan pinset. Kontrol negatif yang digunakan aquades steril. Lalu masukkan cawan petri ke dalam inkubator dan inkubasi selama 1x24 jam dengan suhu 370C. lalu amati zona beningnya dan diukur menggunakan jangka sorong (Sari, *et al*.,2019).

### 3.11.2 Metode Dilusi Cair

#### 3.11.2.1 Konsentrasi Hambat Minimum

Metode yang digunakan adalah metode serial dilusi atau pengenceran bertingkat. Metode pengujian menggunakan turbidimetri. Sebanyak 10 tabung reaksi steril disiapkan. Setiap tabung dimasukkan media Mueller Hinton Broth(MHB) sebanyak 3,5 mL dan 0,5 mL bakteri C. acnes ATCC 11827 yang setara dengan standar Mc.Farland 0,5. Setiap tabung uji diberi label 1- 8, kemudian tabung 9 diberi label K (+) yang merupakan kontrol positif, yaitu tabung yang berisi media dan ekstrak. Tabung 10 diberi label K(-) yang merupakan kontrol negatif, yaitu tabung berisi Media dan bakteri . Tabung 1-8 dimasukkan ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% dan nanopartikel ekstrak daun pepaya 10%, 5%, 2,5%, 1,25% dan 0,625%, 0,3125%, 0,156%, 0,078% masing masing sebanyak 1 mL dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri uv-vis.

Selanjutnya media tabung perlakuan diinkubasi selama 1x24 jam dan kemudian dilakukan kembali pengukuran absorbansi kembali menggunakan spektrofotometri uv-vis, semua tabung tersebut dilihat kekeruhannya secara visual, bila kekeruhan masing-masing tabung masih setara atau lebih keruh dari tabung K(+) yang berisi media dan suspensi *Cutibacterium acnes* berarti bakteri masih dapat bertumbuh, tetapi bila larutan dalam tabung terlihat mulai lebih jernih daripada tabung K(-) berarti pertumbuhan bakteri mulai terhambat. Hal inilah yang menunjukkan konsentrasi hambat minimum (KHM). Kadar hambat minimum ditentukan dengan konsentrasi ekstrak terkecil pada tabung perlakuan yang sudah mulai menghambat pertumbuhan bakteri.

#### 3.11.2.2 Konsentrasi Bunuh Minimum

Sebanyak 15 mL Mueller Hinton Agar Mueller Hinton Agar (MHA) dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan selama beberapa menit sehingga menjadi padat. Kemudian dipipet sejumlah 0,1 mL dari tiap -tiap pengenceran kemudian disebarkan di atas media Mueller Hinton Agar (MHA) steril. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37oC. KBM ditentukan dengan pengamatan ada tidaknya pertumbuhan bakteri dalam media agar setelah diinkubasi. Konsentrasi terendah yang memperlihatkan kematian bakteri (tidak ada pertumbuhan) merupakan nilai KBM. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif berupa konsentrasi terendah dari ekstrak yang mampu menghambat dan membunuh *Cutibacterium acnes*.

## 3.12 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan setelah diinkubasi selama 24  jam. Zona hambat bening yang terbentuk diukur diameternya menggunakan penggaris dalam satuan milimeter (mm) dengan cara mengukur ujung tepi zona ke ujung tepi zona lainnya melintasi zona bening melewati di atas titik pusat kertas cakram (disk) (kertas cakram termasuk dalam perhitungan), hingga diperoleh nilai  zone of inhibition (ZOI) atau nilai zona hambat (Purniasih,*et al.* 2022).

## 3.13 Analisa Data

Data yang diperoleh pada pengujian aktivitas antibakteri diolah secara statistik dengan metode one way ANOVA pada taraf kepercayaan 95% dengan menggunakan program SPSS.