# BAB III METODE PENELITIAN

## Rancang Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode penelitian eksperimental, dimana variable bebas pada peneltian ini yaitu simplisia daun matoa (*Pometia pinnata*), ekstrak etanol daun matoa (*Pometia pinnata*), nanopartikel ekstrak etanol daun matoa (*Pometia pinnata*), dan uji aktivitas antibakteri difusi dan dilusi. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu pemeriksaan karakterisasi simplisia, skrining fitokimia, karakterisitik nanopartikel ekstrak etanol daun matoa (*Pometia pinnata*), uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan analisis data. Rancangan meliputi pegumpulan dan pengolahan sampel, skrining fitokimia, pemeriksaan karakterisasi simplisia pembuatan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia pinnata*), pembuatan nanopartikel esktrak daun matoa dan uji aktivitas antibakteri

### Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pembuatan simplisia dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia pinnata*), pembuatan nanopartikel ekstrak etanol daun matoa, dan aktivitas antibakteri aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji karakteristik, skrining fitokimia, karakteristik nanopartikel daun matoa, dan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

### Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Parameter karakteristik dari serbuk simplisia daun matoa meliputi kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.

Parameter skrining fitokimia metabolit sekunder dari serbuk dan ekstrak etanol daun matoa meliputi adanya senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/ triterpenoid, dan glikosida.

Parameter karakteristik nanopartikel ekstrak etanol daun matoa dengan menggunakan uji Particle Size Analyzer (PSA) adalah ukuran partikel dalam satuan nanometer (nm).

Parameter aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun matoa dan nanopartikel ekstrak etanol daun matoa dengan menggunakan metode difusi adalah diameter zona hambat untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan metode dilusi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

## Jadwal dan Lokasi Penelitian

### Jadwal Penelitian

Penelitian ini di lakukan pada bulan Februari 2024

### 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.

## Bahan dan Peralatan

### Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun matoa, etanol 96%, HCL 2N, FeCl3 1%, Kloralhidrat, Bouchardat, Dragendorff, Mayer, Kloroform, media Nutrient Agar (NA), media Mueller Hinton Agar (MHA), cakram amoksisilin 25µg, kitosan 0,1%, natrium tripolifosfat (Na-TPP) 0,1%, asam asetat, DMSO (Dimetil Sulfoksida), anhidrat larutan standar Mc.Farland 0,5, NaCl steril 0,9%, BaCl2.2H2O, H2SO4 1%, aquadest, bakteri *Staphylococcus aureus*.

### Peralatan Penelitian

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 (*Memmert*), pipet tetes, blender, ayakan, toples kedap udara, Particle Size Analyzer (*Fritsch*), tabung reaksi, cawan petri, lampu spritus.

## Persiapan Bahan

### Determinasi Sampel

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium jurusan biologi FMIPA Universitas Syiah Kuala Banda Aceh Jalan Syech Abdul Rauf, No. 3 Banda Aceh.

### Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan disekitaran kota aceh dengan pengambilan secara acak.

### Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel dilakukan secara purposif yaitu mengambil tanaman dengan sengaja dari suatu tempat tanpa membandingkan dengan hasil dari daerah yang lain.

### Pembuatan Simplisia Daun Matoa

Sampel daun matoa dikumpulkan, lalu dilakukan sortasi basah dengan memisahkan bagian pada daun yang tidak diperlukan selanjutnya dicuci dengan air mengalir, daun matoa yang yang telah dibersihkan lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka yang terhindar dari sinar matahari langsung, kemudian dikeringkan dengan lemari pengering hingga kering. Daun matoa (Pometiae pinnatae folium) yang sudah kering, disortasi kering dengan cara membuang batu atau benda lain yang masuk pada pengeringan, dan dibuat serbuk dengan cara diblender dan diayak. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat (Depkes RI, 2008).

### Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Matoa

Pembuatan ekstrak etanol daun matoa dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 10 bagian (800 g) serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian etanol sebanyak 6000 ml dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sering diaduk lalu diperas sehingga didapat maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol sebanyak 2000 ml sehingga diperoleh maserat II. Maserat I dan II digabung, kemudian dipindahkan ke dalam bejana tertutup dibiarkan di tempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian dienaptuangkan sehingga diperoleh ekstrak cair, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50oC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

## Pembuatan Larutan Pereaksi

### Asam Klorida 2N

Asam klorida pekat sebanyak 17 mL ditambahkan air suling sampai volume 100 mL (Depkes RI, 1995).

### FeCI3 1%

Besi (Ⅲ) klorida ditimbang 1 gram, kemudian dilarutkan dengan air suling di dalam labu tentukur 100 mL hingga tanda batas (Depkes RI, 1989).

### Bouchardat

Iodide ditimbang sebanyak 4 gram, dilarutkan dalam air suling secukupnya, lalu ditambahkan 2 gram iodium sedikit demi sedikit secukupnya dengan air suling hingga 100 mL (Depkes RI, 1995).

### Pereaksi Dragendorff

Bismuth (III) nitrat sebanyak 0,8 gram dilarutkan dalam asam nitrat 20 mL kemudian dicampurkan dengan 50 mL kalium iodide sebanyak 27,2 gram dalam 50 mL air suling. Didiamkan sampai memisah sempurna, selanjutnya diambil lapisan jernih nya, diencerkan dengan air hingga diperoleh 100 mL (Depkes RI, 1995).

### Pereaksi Mayer

Raksa (II) klorida sebanyak 1,569 gram dilarutkan dengan air suling hingga 60 mL. Pada wadah lain 5 gram kalium iodide dilarutkan dalam 10 mL air suling. Kedua larutan dicampur, ditambahkan air suling hingga 100 mL (Depkes RI, 1995).

### Pereaksi Kloralhidrat

Pereaksi kloralhidrat dibuat dengan cara melarutkan kloralhidrat sebanyak 50 gram dalam 20 mL air (Ditjen POM, 1995).

## Karakterisasi Simplisia Daun Matoa

### Makrokopis Daun Matoa

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk luar dari daun matoa meliputi warna, bentuk, bau, rasa dan ukuran daun (Ditjen POM, 1979).

### Mikrokopis Serbuk Simplisia Daun Matoa

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun matoa. Serbuk simplisia daun matoa diletakkan di atas kaca objek yang telah ditetesi dengan larutan kloralhidrat kemudian dipanaskan sebentar di atas api Bunsen dan ditutupi dengan cover gelas dan diamati di bawah mikroskop (Ditjen POM, 1979).

### Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air serbuk daun matoa (*Pometia Pinnata*) dilakukan dengan cara destilasi. Menimbang sejumLah serbuk daun matoa (*Pometia Pinnata)* yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 mL air dan masukkan ke dalam labu kering. Kemudian tambahkan 200 mL toluen ke dalam labu yang berisi serbuk daun matoa (*Pometia Pinnata)*, lalu di panaskan selama 15 menit. Setelah toluene mendidih, penyulingan di atur dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes perdetik di awal penyulingan dan di naikkan menjadi 4 tetes tiap detik. Penyulingan di hentikan saat seluruh air telah di suling. Untuk memastikan adanya air yang belum tersuling, maka di lakukan penyulingan kembali selama 5 menit. Setelah air dan toluen pada tabung penerima memisah, maka dilakukan perhitungan kadar air dengan cara menghitung (Depkes RI, 1989).

%Kadar air simplesia $=\frac{\left(Volume akhir air-Volume awal air\right)}{Berat Sampel (gram)} x 100\%$

### Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia daun matoa (*Pometia Pinnata*) dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform (2,5 mL kloroform dalam air suling sampai 100 mL ) dalam labu bersumbat sambil di kocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam, disaring 20 mL dipipet dan diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah ditara dan dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

%Kadar sari larut dalam etanol$=\frac{Berat Sari Larut Air (gr)}{Berat sampel (gr)}+\frac{100}{20}x 100\%$

### Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia daun matoa (*Pometia Pinnata*) dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL etanol 96% dalam labu bersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, 20 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan berdasar rata yang telah ditara dan sisanya dipanaskan pada suhu 105oC sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

%Kadar sari larut dalam etanol$=\frac{Berat Sari Larut Air (gr)}{Berat sampel (gr)}+\frac{100}{20}x 100\%$

### Penetapan Kadar Abu Total

Simplisia serbuk daun matoa (*Pometia Pinnata*) di timbang sebanyak 2 sampai 3 gram, di masukan ke dalam cawan krus silika yang telah di pijarkan dan di tara, sampel dan cawan krus di pijarkan hingga arangnya habis, kemudian di dinginkan dan timbang (FHI, 2008). Jika arang tidak habis atau hilang, ditambahkan air panas kemudian aduk dan dilakukan penyaringan dengan kertas saring bebas abu sisa yang dipijarkan pada cawan krus yang sama. Filtrat yang didapat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan sampai bobotnya tetap kemudian timbang. Kadar abu dihitung terhadap berat bahan uji dinyatakan dalam % b/b (Depkes RI, 1989).

 kadar abu total$=\frac{Berat Abu Sisa Pijar(gr)}{Berat Simplisia (gr)}X 100\%$

### Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari kadar abu total serbuk daun matoa (*Pometia Pinnata*) di didihkan dengan menggunakan HCl sebanyak 25 mL selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam di saring menggunakan kertas saring bebas abu, kemudian di cuci dengan air panas dan di pijarkan dalam krus sampai bobot yang di konstan. Kadar abu tidak larut asam di hitung terhadap berat bahan uji yang dinyatakan dalam (% b/b) (Depkes RI, 1989).

% Kadar abu tak larut asam $=\frac{Berat krus+abu -Berat Krus Kosong}{Berat Simplisia (gr)}X 100\%$

## Skrining Fitokimia

### Uji Alkaloid

Serbuk dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia Pinnata*) ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida dan 9 mL aquades, dipanaskan air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut: Diambil 3 tetes filtrat, masukkan ke dalam masing-masing 3 tabung reaksi lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, 2 tetes peeaksi Bourchardat, 2 tetes pereaksi Dragendorff. Alkaloida dianggap positif jika terjadi endapan paling sedikit dua atau tiga dari percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

### Uji Flavonoid

Sebanyak 10 g serbuk dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia Pinnata*) di timbang dan di tambahkan air suling panas 100 mL. didih kan selama 5 menit, setelah itu di saring dalam keadaan panas. Kedalam 5 mL filtat di tambahkan serbuk magnesium dan 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok kuat dibiarkan larutan memisah. Dikatakan positif flavonoid dengan adanya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

### Uji Saponin

Sebanyak 0.5 g Serbuk dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia Pinnata*) ditambahkan 10 mL air suling panas, lalu di kocok kuat- kuat selama 10 menit. Jika terbentuk busa dengan tinggi 1 sampai 10 cm yang stabil tidak kurang 10 menit dan tidak hilang bila di tambahkan 1 tetes HCl 2N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### Uji Tanin

Sebanyak 1 g serbuk dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia Pinnata*) di sari dengan 10 mL air suling lalu di saring. filtrat di encerkan menggunakan air suling hingga bening. Larutan diambil sebanyak 2 mL lalu di tambahkan pereaksi besi (III) klorida 1% sebanyak 1 sampai 2 tetes jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman mendadakan adanya tanin (Depkes RI, 1995).

### Uji Steroid

Sebanyak 1 g serbuk dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia Pinnata*) dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetesasam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liberman-burchard). Terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1995).

### Uji Glikosida

Serbuk dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia Pinnata*) ditimbang serbuk 3 gram ditambahkan 30 ml campuran etanol 96% dengan aquadest (7:3) selama 10 menit, dinginkan lalu saring. Diambil 20 ml filtrat tambahkan 25 ml air dan 25 ml timbal (II) asetat 0, 4 M. Lalu dikocok, diamkan selama 5 menit, saring. Saring filtrat 3 kali, tiap kali dengan 20 ml campuran 3 bagian kloroform P dan 2 bagian isopropanol P. Setelah itu kumpulkan sari tambahkan natrium sulfat anhidrat P, saring dan uapkan pada suhu tidak lebih 50℃. Lalu larutkan sisa dengan 2 ml methanol P

1. Uapkan 0,1 ml larutan di *water bath*, larutkan sisa ditambahkan 5 ml asam asetat anhidrat P. Lalu tambah 10 tetes asam sulfat P terbentuk warna biru atau hijau.
2. Masukkan 0,1 ml larutan dalam tabung reaksi, uapkan di *water bath*. Filtat ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes Molish LP. Tambahkan hati-hati 2 ml asam sulfat P. Setelah itu akan terbentuk cincin warna ungu pada batas cairan menunjukkan ikatan gula (Depkes RI, 1989).

### Uji Triterpenoid

Sebanyak 1 g serbuk dan ekstrak etanol daun matoa (*Pometia Pinnata*) dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liberman-burchard). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoida (Depkes RI, 1995).

## Pembuatan Larutan Kitosan 0,1%

Larutan kitosan dibuat dengan memasukkan 100 mL asam asetat 1% ke dalam gelas beker 250 mL. Dimasukkan 0,1 g kitosan yang kemudian diaduk dengan magnetic stirrer hingga kitosan larut dan diperoleh larutan kitosan 0,1% (Natasya, 2018).

## Pembuatan Larutan NaTPP

Larutan NaTPP dibuat dengan menambahkan 0,035 g Na-TPP ke dalam 35 mL aquades menggunakan gelas beker 250 mL. Larutan tersebut diaduk dengan magnetic stirrer hingga terlarut dan diperoleh larutan NaTPP 0,1% (Natasya, 2018).

## Pembuatan Nanopartikel Ekstrak etanol daun matoa

Реmbuatan nanopartikel ekstrak etanol daun matoa dibuat dengan 2 beaker, dilakukan dengan menimbang 1g ekstrak etanol daun matoa. Ekstrak etanol daun matoa dilarutkan dalam 35 mL etanol 96% dicampur dengan 15 mL akuades dalam beaker 1000 mL. Kemudian ditambahkan dengan 100 mL larutan kitosan 0,1%, kemudian di dalam campuran tersebut ditambahkan 35 mL Na-TPP sambil diaduk dengan homogenizer 2000 rpm selama 15 menit. Setelah semua bahan tercampur kemudian diaduk kembali dengan magnetic stirrer dengan kecepatan 1000 rpm lebih kurang selama 2 jam dengan kecepatan stabil. Kemudian koloid nanopartikel kinan dan Na-TPP daun matoa dipisahkan dengan sentrifugasi pada speed 8 selama 10 menit. Lalu padatan nanopartikel ekstrak etanol daun matoa dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 3°C sampai menjadi padatan kering (Kurniasari, 2016).

## Karakterisitik Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Matoa

### Distribusi Ukuran Partikel

Nanopartikel kitosan ekstrak dan natos dikarakterisasi menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) untuk mengetahui ukuran partikel yang dihasilkan (Nataya, 2018). Pada karakterisasi ukuran partikel dengan PSA, spesimen 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).

## Uji Aktivitas Antibakteri

### Sterilisasi Alat

Sterilisasi dalam penelitian ini menggunakan dua cara yaitu sterilisasi panas basah menggunakan autoklaf dan sterilisasi panas kering menggunakan oven. Alat yang akan disterilkan dicuci dahulu sampai bersih kemudian dikeringkan dengan hairdryer. alat-alat yang tidak tahan pemanasan dan media biakan biakan bakteri disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit. Alat-alat yang disterilkan dalam autoklaf dibungkus dahulu dengan kertas coklat. Alatalat gelas yang tidak digunakan untuk pengukuran dan alat yang tahan pemanasan disterilkan dengan oven yang sebelumnya telah dibungkus dengan aluminium foil pada suhu 180℃ selama 30 menit (Panji *et al*, 2022).

### Sumber Isolat Bakteri

Isolat bakteri *Staphylococcus aureu* dan *Escherichia coli* berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.

### Pembuatan Media MHA

Komposisi :

Acid hydrolysate of casein 17.5 gram

Beef Extract 2 gram

Starch 1.5 gram

Agar 17 gram

Aquadest 1 L

Sebanyak 9,5 gram media MHA si timbang dan dimasukkan kedalam erlenmeyer dan di larutkan dengan aquadest sebanayak 250 mL dan lalu dipanaskan hingga larut. Kemudian di sterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 1210C selama 15 menit (Miksusanti,*et al*.,2011).

### Pembuatan Media MHB

Komposisi :

Tryptone: 10 gram

Ekstrak Kedelai: 3 gram

Glycerol: 1.5 gram

Sodium chloride (NaCl): 5 gram

Kalsium klorida (CaCl₂): 0.2 gram

Magnesium sulfat (MgSO₄): 0.2 gram

Sebanyak 1,2 gram media MHB si timbang dan dimasukkan kedalam erlenmeyer dan di larutkan dengan aquadest sebanayak 60 mL dan lalu dipanaskan hingga larut. Kemudian di sterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 1210C selama 15 menit (Miksusanti,*et al*.,2011).

### Pembuatan Media NA

Komposisi :

NA 20 gram / L

Pepton From meat 5 gram

Agar-Agar 12 gram

Aquadest 1 L

Meat Extract 3 gram

Sebanyak 6,72 gram nutrient agar ditimbang dan dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan aquadest lalu di panaskan hingga larut, tutup mulut erlenmeyer dengan kapas dan dan aluminium foil lalu sterilkan di autoklaf selama 15 menit dengan suhu 1210C (Miksusanti,*et al*.,2011).

### Pembuatan Larutan Standar *MC Farland*

Standart McFarland 0,5 menunjukkan konsentrasi kekeruhan suspensi bakteri setara dengan 1,5x108 CFU/mL. Larutan H2SO4 1% sebanyak 9,95 mL dicampurkan dengan larutan BaCl2.2H2O 1% sebanyak 0,5 mL dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Kumowal *et al*., 2019).

### Peremajaan Bakteri

Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diambil dari kultur menggunakan jarum ose lalu tanam pada *nutrient agar* (NA) dengan menggores pada media. Lalu inkunbasi 1x24 jam dengan suhu 370C. lalu amati koloni yang tumbuh*.* Lalu inokulasi pada agar miring NA dengan menggoreskan koloni yang pada jarum ose secara aseptis. Lalu diinkubasi selama 1x24 jam disuhu 370C. koloni yang tumbuh digunakan sebagai pengujian aktivitas antibakteri.

### Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang telah diinkubasi menggunakan jarum ose diambil lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi larutan NaCl 0.9% sebanyak 10 mL. Lalu di homegenkan menggunakan vortex. Hasil kekeruhan dibandingkan dengan kekeruhan Mc Farland , yang dimana mempunyai konsentrasi 108 CFU/mL. Lalu pipet 0.1 mL biakan bakteri lalu masukkan kedalam tabung yang berisi NaCl 0.9 % steril sebanyak 9.9 mL dan di vortex. Kemudian didapatkan suspensi koloni berkonsentrasi 106CFU/mL .

## Pengujian Aktivitas Antibakteri

### Metode Difusi Cakram

Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan menggunakan metode cakram. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diambil menggunakan cotton bud steril. Cotton bud steril dimasukkan kedalam suspensi bakteri dengan diperas di pinggir tabung. Kemudian cotton bud di goreskan ke media MHA. Lalu letakkan kertas cakram berisi larutan kosentrasi ekstrak dan nanopartikel ekstrak etanol daun matoa, letakkan juga kontrol positif (Kloramfenikol) menggunakan pinset. Kontrol negative yang digunakan DMSO. 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).

### Metode Dilusi Cair

Metode yang digunakan ialah metode serial dilusi atau pengenceran bertingkat. Metode pengujian menggunakan turbidimetri. Sebanyak 10 tabung reaksi steril disiapkan. Setiap tabung dimasukkan media *Muller Hinton Broth* (MHB) sebanyak 3,5 mL dan 0,5 mL bakteri *Staphylococcus aureu* dan *Escherichia coli* ATCC 25923 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 bakteri. Tabung 10 diberi label K(-) yang merupakan kontrol negatif, yaitu tabung berisi Media. Tabung 1-8 dimasukkan ekstrak etanol daun matoa (Pometia pinnata) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% dan nanopartikel ekstrak etanol daun matoa 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 *Staphylococcus aureus*  dan *Escherichia coli* 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.

### Metode Dilusi Padat

Sebanyak 25 mL MHA dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan selama beberapa menit sehingga menjadi padat. Kemudian dipipet sejumLah 0,1 mL dari tiap -tiap penegenceran kemudian disebarkan di atas media 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 diproleh dianalisa secara deskriptif berupa konsentrasi terendah dari ekstrak yang mampu menghambat dan membunuh *Staphyloccus aureus* dan *Escherichia coli*.

### 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 (Hudzicki, 2009).

## Analisa Data

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