

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kemangi

Daun kemangi (*Ocimum Basilicum*) adalah tanaman aromatik yang kaya akan minyak esensial dan senyawa fenolik. Beberapa kandungan dalam daun kemangi dinilai mampu menjaga daya tahan tubuh dan mencegah berbagai macam penyakit (Yamlean, 2017).



Gambar 2. 1 Daun Kemangi

1. Toksonomi Daun Kemangi

| | |
|---------------|--------------------|
| Kingdom | : Plantae |
| Sub kingdom | : Tracheobionta |
| Superdivision | : Spermatophyta |
| Division | : Magnoliophyta |
| Kelas | : Magnoliopsida |
| Sub kelas | : Asteridae |
| Ordo | : Lamiales |
| Family | : Lamiaceae |
| Genus | : Ocimum |
| Spesies | : basilicum |
| Nama binomial | : Ocimum basilicum |

2. Morfologi Daun Kemangi

Daun kemangi memiliki ukuran panjang 2,5 – 5cm, berwarna hijau berbentuk lanset (lanceolate) hingga bundar telur dengan permukaan rata atau berombak. Batang pada kemangi berwarna hijau kadang keunguan dengan tinggi mencapai 0,6-0,9 m. Bunga daun kemangi

berwana putih hingga merah muda dengan tangkai penunjang lebih pendek dari kelopak (Handayani, 2023).

3. Kandungan Daun Kemangi

Daun kemangi memiliki banyak kandungan senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, saponin, tannin, fitosterol, karbohidrat, senyawa fenolik, pati, lignin, dantrakuinon dan terpenoid. Kandungan paling utama pada kemangi yaitu minyak atsiri. Kandungan minyak atsiri pada kemangi terdiri dari fenilpropanoid (estragole, methyl cinnamate, eugenol, metyhleugenol), dan terpenoid ((linalool, geraniol, geranial). Selain itu kandungan pada ekstrak daun kemangi seperti flavonoid, saponin, glikosida, alkaloid, tannin, dan minyak atsiri termasuk dalam golongan senyawa fenolik yang dikenal sebagai antiseptik. Senyawa fenolik yang berkorelasi dengan protein pada dinding bakteri akan mempengaruhi kerusakan, menurunkan kualitas cairan membran, membran sitoplasma, menghambat sintesis asam nukleat, sintesis dinding atau metabolisme energi seluler (Darmaputri, 2022).

Kandungan senyawa pada daun kemangi meliputi flavonoid, tannin, saponin, dan steroid/triterpenoid. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dapat merusak protein dan mengganggu aktivitas metabolisme mikroba yang dapat menyebabkan bakteri mati. Tannin merupakan senyawa yang bersifat toksik dan merusak membran sel bakteri. Saponin merupakan senyawa yang dapat menghambat stabilitas membran bakteri dan dapat mengakibatkan sel bakteri hancur akibat adanya peningkatan yang terjadi pada dinding sel bakteri yang menyebabkan kontraksi kuat sehingga membrane sel bakteri hancur. Steroid merupakan senyawa yang bekerja untuk menurunkan integritas membran melalui hubungan dengan membran fosfolipid sehingga mengakibatkan sel menjadi rapuh dan lisis. Eugenol merupakan senyawa yang bertanggung jawab pada aktivitas antibakteri pada daun kemangi. Eugenol

merupakan senyawa fenolik yang larut dalam eter, etanol, kloroform dan minyak lemak namun sedikit larut dalam air (Darmaputri, 2022).

Selain memiliki kandungan antibakteri ekstrak kemangi juga memiliki kandungan antijamur. Aktivitas antijamur pada daun kemangi memiliki kandungan senyawa flavonoid, saponin, tannin, terpenoid, dan steroid. Kandungan senyawa tersebut memiliki mekanisme yang bisa menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* dan *Candida albicans*. Senyawa flavonoid yang bersifat lipofilik dapat mendenaturasi protein sel pada jamur. Senyawa saponin memiliki hidrofilik dan hidrofobik yang dapat mengubah reaksi dengan protein membran jamur. Senyawa tannin memiliki kemampuan untuk menghambat ekskresi enzim, meningkatkan adhesi, dan menonaktifkan enzim yang mengkatalisasi reaksi transkripsi kebalikan dari RNA tunggal dan mengubahnya menjadi DNA ganda. Senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan jamur dengan mekanismenya yaitu mengganggu proses pembentukan membran sel atau dinding sel (Hasanah, 2023).

4. Manfaat Daun Kemangi

Daun kemangi memiliki banyak manfaat diantaranya aktifitas biologi yang telah diteliti dari ekstrak daun kemangi dapat digunakan sebagai penyegar mulut, antidepresan, antipiretik, antidiabetik, antihiperlipidemik dan antibakteri. Selain itu kandungan kemangi dapat dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional dan telah diketahui kandungan bioaktifnya sebagai insektisida, nematisida, fungisida dan antimikroba. Kandungan minyak atsiri pada kemangi biasanya dimanfaatkan dalam campuran parfum, sediaan farmasi, dan bahan tambahan makanan (Wahid, 2020). Kandungan kemangi juga bermanfaat dalam beberapa macam penyakit, diantaranya :

a. Mencegah kanker

Kemangi memiliki kandungan *phytochemical* yang dapat membantu mencegah kanker secara alami (Handayani, 2023).

b. Menjaga Kesehatan Jantung

Daun kemangi dapat membantu otot mengontrol fungsi pembuluh darah untuk berkontraksi dan berelaksasi, serta meningkatkan tekanan darah. Selain itu kemangi juga dapat membantu mencegah agregasi trombosit berbahaya yang menyebabkan jantung berhenti (Handayani, 2023).

c. Mencegah Penuaan Dini

Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa daun kemangi memiliki khasiat yang dapat membantu melindungi kulit dari efek penuaan dini (Handayani, 2023).

d. Melawan Radikal Bebas

Daun kemangi memiliki kandungan antioksidan alami yang dapat membantu melindungi jaringan tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas (Handayani, 2023).

2.2 Sabun

Berdasarkan SNI 3532 tahun 2021 sabun mandi merupakan sediaan yang digunakan untuk membersihkan kulit yang terbuat dari proses saponifikasi atau netralisasi dari lemak, wax, minyak, resin atau asam dengan basa organik tanpa menimbulkan iritasi pada kulit. Sabun dibuat dengan 2 cara yaitu proses saponifikasi dan netralisasi minyak. Pada proses saponifikasi diperoleh gliserol. Proses saponifikasi berlangsung karena reaksi antara trigliserida dengan alkali. Sedangkan proses netralisasi terjadi karena reaksi antara asam lemak bebas dengan alkali. Menurut (Astuti, 2021) sabun merupakan bahan pembersih yang mampu membersihkan kotoran seperti debu serta sisa metabolisme. Kemampuan sabun untuk mengontrol sejumlah bakteri patogen menjadikan sabun sebagai salah satu pembersih. Sedangkan menurut (Rusli, 2019) sabun padat adalah sabun yang dibuat dari reaksi saponifikasi yang berasal dari lemak padat dengan NaOH yang dapat digunakan untuk membersihkan badan.

Sabun dibedakan menjadi 3 macam, yaitu

1. Sabun Padat

Sabun padat adalah sabun dengan bentuk padat atau batang yang terbuat dari reaksi saponifikasi dari NaOH dengan minyak nabati atau lemak (Ningrum, 2021). Menurut (Puspitasari, 2023) sabun padat merupakan sabun yang berbentuk kompak dan tidak tembus cahaya yang terbentuk dari reaksi saponifikasi dari NaOH dengan minyak yang banyak beredar dipasaran.

2. Sabun Cair

Menurut Badan Standarisasi Nasional (1996) sabun cair merupakan sediaan pembersih kulit yang berbentuk cair yang terbuat dari bahan dasar sabun dengan penambahan lain tanpa menimbulkan iritasi pada kulit. Menurut (Irmayanti, 2014) sabun mandi cair merupakan sediaan berbentuk cair yang dapat digunakan untuk membersihkan kulit dengan penambahan bahan kimia yang diijinkan dan dapat digunakan untuk mandi tanpa menimbulkan iritasi pada kulit. Sabun cair dibuat melalui reaksi saponifikasi antara minyak dan lemak dengan KOH.

3. Sabun Transparan

Sabun transparan adalah salah satu inovasi dari sabun padat. Salah satu keunggulan dari sabun transparan yaitu busa yang dihasilkan lebih halus daripada sabun padat. Transparansi sabun padat dipengaruhi oleh kandungan gula, alkohol, dan gliserin (Widiyasanti, 2016). Menurut (Lubena, 2022) sabun transparan merupakan jenis sabun yang dapat digunakan pada wajah (sebagai sabun kecantikan) dan sabun yang dapat digunakan untuk mandi dan menghasilkan busa yang lembut pada kulit dan dapat digunakan untuk merawat kulit karena mengandung bahan-bahan yang dapat berfungsi sebagai humektan.

2.3 Syarat Mutu Sabun

Tabel 2 1 Syarat mutu sabun

| No. | Kriteria Uji | Satuan | Mutu |
|-----|--------------|-----------------|--------------|
| 1. | Kadar air | Fraksi massa, % | Maksimal 23 |
| 2. | pH 0,1% | | 6,0-11,0 |
| 3. | Total lemak | Fraksi massa, % | Minimal 60,0 |

| | | | |
|-----|--|------------------|--------------------------|
| 4. | Bahan tidak larut dalam etanol | Fraksi massa, % | Maksimal 10,0 |
| 5. | Alkali bebas (dihitung sebagai NaOH) | Fraksi massa, % | Maksimal 0,1 |
| 6. | Asam lemak bebas (dihitung sebagai asam oleat) | Fraksi massa, % | Maksimal 2,5 |
| 7. | Kadar klorida (Cl) | Fraksi massa, % | Maksimal 1,0 |
| 8. | Lemak tidak tersabunkan | Fraksi massa, % | Maksimal 0,5 |
| 9. | Cemaran mikroba | | |
| 10. | Angka Lempeng Total (ALT) | Koloni/g | Maksimal 1×10^3 |
| 11. | Angka Kapang dan Khamir | Koloni/g | Maksimal 1×10^3 |
| 12. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Per 0,1 g contoh | Negatif |
| 12. | <i>Staphylococcus aureus</i> | Per 0,1 g contoh | Negatif |
| 13. | <i>Candida albicans</i> | Per 0,1 g contoh | Negatif |

1. Kadar air

Kadar air merupakan salah satu parameter syarat mutu sabun sabun yang digunakan untuk menilai berapa lama penyimpanan suatu produk. Kadar air yang tinggi pada sabun dapat menyebabkan reaksi berlebihan antara air dengan lemak yang tidak tersaponifikasi untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol dalam proses hidrolisis sabun. kandungan air yang tinggi pada sabun menyebabkan sabun lebih cepat mengalami penyusutan bobot. Sedangkan kadar air yang rendah pada sabun akan meningkatkan umur simpan produk (Setiawati, 2020).

2. Total lemak

Total lemak adalah jumlah seluruh lemak yang sudah atau belum mengalami reaksi dengan alkali. Pada sabun asam lemak yang terdapat didalamnya berasal dari bahan baku minyak nabati yang digunakan (Ningrum, 2021). Asam lemak pada sabun memiliki kemampuan yang

terbatas untuk larut dalam air sehingga menyebabkan sabun akan lebih tahan lama (Fanani, 2020).

3. Bahan tidak larut etanol

Bahan tidak larut etanol difungsikan untuk mengetahui kadar sabun yang tidak larut dalam etanol. Suatu zat akan dapat larut dalam pelarut jika mempunyai polaritas yang sama. Bahan tidak larut etanol pada sabun meliputi silikat, fosfat, karbonat, sulfat dan pati (Fanani, 2020).

4. Alkali bebas

Alkali bebas merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui jumlah basa yang tidak terikat oleh asam lemak. Alkali bebas memiliki sifat yang keras, sehingga sabun yang memiliki kandungan alkali yang tinggi dapat menyebabkan iritasi pada kulit karena kandungan NaOH yang bersifat higroskopis dapat menyerap kelembapan kulit dengan cepat. Kandungan alkali bebas pada sabun dapat dinyatakan dengan terbentuknya perubahan warna pada saat penambahan indikator fenofalein menjadi warna merah muda. Apabila pada saat penambahan indikator fenofalein tidak terjadi perubahan warna maka yang dilakukan kadar asam lemak bebas yang dihitung sebagai asam oleat (Fanani, 2020).

5. Asam lemak bebas

Asam lemak bebas merupakan asam lemak yang berada sebagai asam bebas yang tidak terikat oleh trigliserida. Asam lemak bebas ini dihasilkan oleh proses hidrolisis dan oksidasi (Irawan, 2013). Adanya asam lemak bebas dalam sabun dapat mengurangi daya ikat sabun terhadap , minyak, lemak maupun keringat (Fanani, 2020).

6. Kadar klorida

Kadar klorida pada sabun merupakan garam dari asam lemak yang berasal dari minyak nabati yang digunakan. Penentuan kadar klorida ini bertujuan untuk mengetahui banyaknya kandungan klorida pada sabun (Salanti, 2022).

7. Lemak tak tersabunkan

Lemak tak tersabunkan adalah jumlah seluruh lemak pada sabun yang belum mengalami reaksi pada alkali. Adanya lemak tak tersabunkan dalam sabun dapat menurunkan kemampuan sabun untuk membersihkan minyak dan kotoran. Lemak tak tersabunkan juga dapat mengurangi busa yang dihasilkan oleh sabun. Adanya lemak tak tersabunkan ini menunjukkan jumlah asam lemak yang tidak terikat oleh basa (Fanani, 2020).

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu bahan dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai. Pada proses ekstraksi, akan dihentikan apabila sudah tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi yang ada pada tanaman. Setelah dilakukan proses ekstraksi, pelarut akan dipisahkan dengan sampel melalui penyaringan (Mukhriani, 2014).

Jenis – jenis ekstraksi, yaitu

1. Ekstraksi padat cair

Ekstraksi padat cair adalah suatu metode ekstraksi yang memisahkan satu atau lebih *solute* dari campurannya dalam padatan yang tidak larut dengan pelarut (*solvent*) berupa cairan (Mukhriani, 2014). Ekstraksi padat cair dibagi menjadi 2 cara, yaitu

a. Ekstraksi dingin

Ekstraksi dingin merupakan metode ekstraksi tanpa melalui pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung. Fungsinya yaitu agar senyawa yang diinginkan tidak mengalami kerusakan.

1. Maserasi

Maserasi adalah proses penyarian yang paling sederhana. Proses ekstraksi ini dilakukan dengan merendam serbuk *simplicia* yang akan digunakan dalam pelarut kemudian dilakukan beberapa kali pengadukan. Umumnya, perendaman dilakukan selama 24 jam setelah itu pelarut diganti dengan pelarut yang baru. Kelebihan dari metode maserasi ini adalah

maserasi efektif untuk senyawa yang tidak tahan panas. Namun kekurangannya adalah membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak dan memungkinkan adanya senyawa yang tidak dapat diekstrak karena kelarutannya rendah (Badaring, 2020).

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses penyarian simplisia dengan melewati pelarut yang sesuai dengan lambat pada simplisia dalam suatu perkolator. Pada metode ekstraksi ini serbuk simplisia direndam dengan pelarut kemudian pelarut yang baru dialirkan sampai warna pelarut tidak lagi berwarna tetap atau bening yang artinya sudah tidak ada lagi senyawa yang terlarut (Sudarwati, 2019).

b. Ekstraksi panas

Ekstraksi panas merupakan metode ekstraksi yang melibatkan panas pada prosesnya. Adanya panas akan mempercepat proses ekstraksi. Beberapa metode ekstraksi panas :

1. Reflux

Reflux merupakan metode sintesis senyawa anorganik yang digunakan apabila dalam sintesis tersebut menggunakan pelarut yang volatile. Prinsip dari metode reflux adalah pelarut yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, kemudian akan didinginkan oleh kondensor sehingga pelarut dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan akan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung (Sudarwati, 2019).

2. Soxhlet

Soxhletasi merupakan metode ekstraksi yang terdapat dalam zat padat dengan penyaringan berulang-ulang menggunakan pelarut tertentu, sehingga semua komponen yang diinginkan akan terisolasi. Dengan pemanasan, uap yang timbul setelah dingin secara kontinyu akan membasahi sampel, kemudian

pelarut akan dimasukkan kembali ke dalam labu dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi (Sudarwati, 2019).

3. Infusa

Infusa adalah metode pemisahan dengan pelarut air. Pada saat proses ekstraksi, pelarut air harus mencapai suhu 90°C selama 15 menit. Proses infusa yaitu serbuk simplisia dipanaskan dalam panci infusa dengan air secukupnya selama 15 menit dihitung dari suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk. Kemudian disaring pada kondisi panas menggunakan kain flannel dengan menambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume yang diinginkan (Sudarwati, 2019).

2. Ekstraksi cair –cair

Ekstraksi cair-cair dilakukan dengan memisahkan campuran dengan bantuan pelarut. Pada proses ekstraksi zat terlarut akan dipisahkan dengan cairan pembawa (dieluen) menggunakan pelarut cair. Setelah dipisahkan akan membentuk 2 fasa yaitu fase diluen (rafinat) dan fase pelarut (ekstrak) (Sudarwati, 2019).

2.5 Bakteri *Salmonella typhi*

Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri gram negatif dan merupakan strain bakteri dari familia *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* merupakan bakteri patogenik enterik dan menjadi bakteri penyebab utama penyakit bawaan dari makanan. Bakteri *Salmonella typhi* ini dapat dikelompokkan berdasarkan perbedaan antigen, yaitu antigen O (somatic), antigen vi (kapsul), dan antigen H (flagel). Spesies *Salmonella* dapat dibedakan menjadai dua, yaitu *Salmonella* dengan spesies *typhoidal* dan *non typhoidal*. *Salmonella* dengan spesies *typhoidal* dapat menyebabkan demam tifoid dan *Salmonella* spesies *non typhoidal* dapat menyebabkan diare (Imara, 2020).

Bakteri *Salmonella* tidak memiliki spora, dapat bergerak dengan flagel peritik, bersifat intraseluler fakultatif dan anaerob fakultatif. Ukuran bakteri ini antara $1-3,5 \times 0,6\mu\text{m}$ dengan besar koloni rata-rata 2-4mm. Bakteri *Salmonella* berbentuk batang, berwarna merah dengan susunan menyebar. Bakteri *Salmonella* mempunyai flagella peritrika yang dapat memberikan difat motil pada *Salmonella* tersebut. flagella yang mengandung protein disebut flagellin yang memberikan signal bahaya pada sistem kekebalan tubuh. Bakteri *Salmonella* merupakan organisme yang dapat tumbuh dengan mudah pada medium sederhana, tetapi hampir tidak pernah memfermentasikan laktosa dan sukrosa.

Bakteri *Salmonella typhi* mampu bertahan hidup selama beberapa bulan jika melekat dalam tinja, mentega, susu keju dan air beku. Suhu optimum bakteri ini dapat tumbuh yaitu 37°C dengan pH antara 6-8. Bakteri salmonella dapat dibunuh dengan pemanasan pada suhu 60°C selama 15-20 menit, pasteurisasi, pendidihan, dan klorinasi (Ulya, 2020).

2.6 Pengujian Bakteri

Uji sensitivitas adalah uji yang digunakan untuk mengetahui kepekaan suatu bakteri terhadap antibiotik. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui efektifitas dari suatu antibakteri. Hasil dari sensitivitas adalah terbentuknya diameter zona hambat. Faktor yang mempengaruhi zona hambat antara lain waktu peresapan bakteri dan konsentrasi yang digunakan. Apabila zona hambat yang terbentuk semakin besar maka pertumbuhan bakteri semakin terhambat.

Uji aktivitas antibakteri dapat dibedakan menjadi 2 yaitu :

1. Dilusi

Dilusi merupakan metode uji yang dapat digunakan untuk menetapkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari suatu senyawa aktif. Keunggulan dari metode dilusi adalah dapat mendeteksi pola resistensi tertentu yang tidak dapat terdeteksi menggunakan metode difusi (Mustapa, 2014). Metode dilusi dibagi menjadi 2 macam, yaitu :

a. Dilusi Cair

Metode dilusi cair bertujuan untuk memperkirakan konsentrasi suatu bakteri dari sampel yang tidak diketahui dengan cara menghitung jumlah koloni yang dibiakan kemudian akan diukur dan memperkecil jumlah bakteri yang terbentuk dalam larutan suspensi. Metode dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan sampel uji (Fitriana, N.A.Y, 2019). Prinsip dari metode dilusi cair yaitu dengan adanya pengenceran terhadap sampel sehingga akan menghasilkan beberapa konsentrasi pengenceran yang kemudian akan ditambahkan dalam suspensi bakteri pada media. Kelemahan dari metode ini adalah adanya seris pengenceran sehingga mengakibatkan konsentrasi sampel yang didapatkan akan terbatas pada konsentrasi tertentu sehingga memungkinkan pada konsentrasi rendah dapat menciptakan daya hambat (Ahsana Nurul, 2023).

b. Dilusi Agar

Prinsip dari metode dilusi agar adalah dengan pengenceran tabung untuk uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang dibuktikan oleh tumbuhnya koloni bakteri (Ahsana Nurul, 2023). Metode dilusi agar dapat dilakukan dengan menginokulasikan mikroba uji pada media agar yang terdapat agen antimikroba (Fitriana, N.A.Y, 2019).

2. Difusi

Metode difusi merupakan metode uji aktivitas antibakteri yang tidak membutuhkan disperse yang homogeny dari suatu zat uji dalam media berair. Zat uji akan diserap dalam kertas cakram atau ditempatkan pada media dan zat uji akan dibiarkan

melakukan kontak dengan kultur mikroba uji (Mustapa, 2014). Metode difusi dibedakan menjadi 2 yaitu :

a. Difusi Cakram

Prinsip dari metode difusi cakram adalah penghambatan pertumbuhan pada mikroorganisme yaitu dengan munculnya zona hambat yang akan terlihat dengan terbentuknya daerah jernih disekitar cakram kertas yang mengandung zat antibakteri (Khusuma, 2019). Metode difusi cakram adalah metode pengukuran daerah zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram yang digunakan untuk mengetahui aktifitas antimikroba. Kertas cakram yang akan digunakan untuk pengujian direndam terlebih dahulu selama 15 menit yang bertujuan untuk larutan menyerap sempurna ke dalam kertas cakram yang selanjutnya akan diletakkan pada media yang telah ditanami oleh bakteri (Intan, 2021). Kelebihan dari metode difusi cakram adalah proses pengujian yang membutuhkan waktu relatif cepat, biaya yang relatif murah, mudah dan tidak memerlukan keahlian khusus. Kelemahan dari metode difusi cakram ini sendiri adalah sulit diaplikasikan pada mikroorganisme yang perkembangan pertumbuhannya lambat dan zona bening yang terbentuk dipengaruhi pada kondisi inkubasi, inokulum dan ketebalan media yang digunakan (Novariyatin, 2024).

b. Difusi Sumuran

Metode difusi sumuran merupakan metode uji antibakteri yang dilakukan dengan membuat lubang pada media agar padat yang sudah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah lubang yang dibuat disesuaikan dengan jumlah sampel, setelah itu dimasukkan sampel ke dalam lubang yang telah dibuat. Kemudian dilakukan inkubasi (Agustina Retnaningsih, 2019).