**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

**3.1 Rancangan Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Tahap penelitian meliputi, identifikasi tumbuhan, pembuatan sari, pembuatan sediaan sabun transparan, evaluasi ediaan sabun, dan uji aktivitas antibakteri pada sediaan sabun transparan.

**3.1.1Variabel Penelitian**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sari lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f*.*) dan formulasi sediaan sabun transparan sari lidah (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) dengan variasi 30%, 40%, 50%, 60% dan 70%. Sedangkan variable terikat pada penelitian ini adalah evaluasi sediaan sabun, dan uji aktivitas antibakteri pada sediaan sabun transparan sari lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

**3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter pada penelitian ini terdiri dari pengujian evaluasi sediaan meliputi ujiorganoleptis, uji kadar air, uji pH, uji tinggi busa, dan uji iritasi.

**3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas MuslimNusantara Al-washliyah dari bulan Maret sampai Agustus 2023

**3.2.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas MuslimNusantara Al-washliyah Medan.

**3.2.2 Jadwal Penelitian**

Waktu penelitian ini adalah mulai Maret sampai Agustus 2023.

**3.3 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, batang pengaduk, gelas ukur, pipet tetes, erlenmeyer, cawan petri, spatel, tabung reaksi, cetakan sabun, magnetic stirrer, hot plate, juicer,ph elektroda, kertas perkamen, rak tabung, incubator, autoklaf, neraca analitik, lampubunsen,pinset, ose steril, swab steril,spatula,cawanpetri,spray, oven dan lemaripendingin.

**3.4 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sari lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), virgin coconut oil (VCO), asam stearate, NaOH, aquadest, gliserin, sukrosa, etanol 96%, propilen glikol (PG), cocamide DEA, pewangi, natriumklorida(NaCl0,9%),NutrietAgar(NA),dan*MullerHilton Agar*(MHA), bakteri *Staphylococcus aureus*.

**3.5 Persiapan Sampel**

**3.5.1 Determinasi Tumbuhan**

Tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini telah di determinasi di laboratorium herbarium madanese (MEDA), Universitas Sumatera Utara Medan. Identifikasi dilakukan bertujuan untuk memastikan kebenaran pada tumbuhan yang digunakan sebagai bahan penelitian.

**3.5.2 Pengumpulan Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), diambil secara *purposive sampling* yaitu sampel diambil pada satu tempat atau daerah saja tidak membandingkannya dengan daerah lain.

**3.5.3** **Pembuatan Sari**

Pengambilan gel lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) dilakukan dengan cara mengupas atau memotong daun lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) yang telah dibersihkan, kemudian bagian daging atau gelnya diambil dan dihancurkan menggunakan blender. Setelah itu disaring barulah di peroleh gel lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) murni.

**3.6 Pembuatan Larutan Pereaksi**

**3.6.1 Larutan Pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam air, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan akuades hingga 100 mL (Depkes RI, 1995).

**3.6.2 Larutan Pereaksi Dragendroff**

Sebanyak 0,8 g bismuth nitrat dilarutkan dalam asam nitrat 20 mL. Pada wadah lain dilarutkan sebanyak 27,2 g kalium iodida dalam 50 mL akuades, kemudian kedua larutan ini dicampur dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan akuades secukupnya hingga 100 mL (Depkes RI, 1995).

**3.6.3 Larutan Pereaksi Mayer**

Raksa (II) klorida sebanyak 1,596 g dilarutkan dalam 60 ml air suling.Pada wadah lain larutan kalium iodida 5 g dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kemudian keduanya dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh volume larutan 100 ml (Depkes RI, 1980).

**3.6.4 Larutan Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 g alpha naftol dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N secukupnya hingga diperoleh 100 ml (Depkes RI, 1979).

**3.6.5 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N**

Asam klorida (P) sebanyak 17 ml ditambahkan air suling secukupnya hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

**3.6.6 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2 N**

Larutan asam sulfat (P) sebanyak 10,32 ml ditambahkan air suling secukupnya hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

**3.6.7 Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2 N**

Sebanyak 8,002 g pellet natrium hidroksida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml (Ditjen POM, 1979).

**3.6.8 Larutan Pereaksi Liberman-Burchard**

Sebanyak 20 bagian asam asetat anhidrat dicampurkn dengan 1 bagian asam sulfat dan 50 bagian kloroform. Larutan pereaksi harus dibuat baru (Harborne, 1987).

**3.6.9 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%**

Besi (III) klorida ditimbang sebanyak 1 g dilarutkan dalam air suling sehingga diperoleh larutan 100 ml (Depkes RI, 1980).

**3.6.10 Larutan Pereaksi Timbal (II) 0,4 M**

Timbal (II) klorida ditimbang sebanyak 15,17 g dilarutkan dalam air

suling bebas karbon dioksida sehingga diperoleh 100 ml (Depkes RI, 1979).

* 1. **Skrining Fitokimia**

Skrining fitokimia meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid,flavonoid, saponin, tanin, glikosida dan steroid/triterpenoid.

**3.7.1 Pemerisaan Alkaloid**

Sari lidah buaya ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai sebagai berikut:

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau bening.

2. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.

3. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendrof, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna jingga. Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi.(Depkes RI, 1995).

**3.7.2 Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 10 g sari ditimbang kemudian ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Ke dalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium, 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

**3.7.3 Pemeriksaan Saponin**

Sebanyak 0,5 ml sari dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 ml aquadest panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat selama 10 menit. Jika terbentuk busa dengan ketinggian 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan busa terbentuk tidak hilang ditambahkan 1 tetes HCL 2N maka menunjukkan adanya saponin (Depkes RI,1995).

**3.7.4 Pemeriksaan Tanin**

Timbang sari sebanyak 0,5ditambahkan10mL aquadest,dikocok dan disaring. Fitrat diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna larutan diambil1 - 2teteslarutanpereaksibesi(III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Ditjen POM,1995).

**3.7.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid**

Ditimbang sebanyak 1 ml sari dimasukkan kedalam beaker gelas, dimaserasi dengan 20 n-heksana selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering. Kemudian ditambahkan 20tetesasamanhidratdan1 tetesasamsulfat(H2SO4)pekat(pereaksiLiebermann Burchard). Apabila terbentuk warna biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroida dan timbul warna merah, merah muda atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Ditjen POM,1989).

**3.7.6 Pemeriksaan Glikosida**

Timbang 10 ml sari dan 30 ml campuran 7 bagian etanol 96% dan 3 bagian aquadest ditambah asam sulfat p dan di refluk selama 10 menit, kemudian didinginkan dan lalu saring. Diambil 20 ml fitrat dan ditambah 10 ml aquadest dan 10 ml timbale (ll) asam 0,4 M, kemudian dikocok dan didiamkan selama 5 menit serta disaring serta dicampurkan dengan 20 ml klorofom dan isofaropanol (3:2) dilakukan 3 kali pengulagan, lalu di uji.

1. Diambil sebanyak 1 mllapisan atas (sari air) diuapkan diatas penangasair. Sisa penguapan ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi Molish. Ditambahkan asam sulfat pekat perlahan-lahan melalui dinding tabung, terbentuk cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya komponen gula (glikon).
2. Diambilsebanyak1mllapisanbawah,diuapkandiataspenangasairsuhutidak lebih dari 60oC. Sisa penguapan dilarutkan dalam 2 mlmetanol. Selanjutnya ditambahkan20tetesasamasetatglasialdan1tetesasamsulfatpekat(pereaksi Liebermann-Bouchard), jika terjadi warna biru atau hijau (reaksi Liebermann- Bouchard) menunjukkan adanya komponen non-gula (aglikon) (Ditjen POM, 1995).

**3.8 Pembuatan Sabun Transparan**

**3.8.1 Formulasi Sediaan Sabun Transparan Lidah Buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.)**

**Tabel 3.1** Formulasi Sabun Transparan (Dewi, 2022).

|  |  |
| --- | --- |
| VCO | 11 gram |
| Asam stearat | 7 gram |
| NaOH 30% | 18 gram |
| Gliserin | 13 gram |
| Sukrosa | 7,5 gram |
| Etanol 96% | 15 gram |
| Aquadest | 4,5 gram |
| Cocamide DEA | 5 gram |
| Propilen glikol | 5 gram |
| Sari lidah buaya | 4 gram |
| Pewangi | qs |
| Jumlah | 90 |

**Tabel 3.2** ModifikasiFormulasi Sabun Transparan Sari Lidah Buaya

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bahan** | **Jumlah (g)** | | | | | |
| **F0** | **F1** | **F2** | **F3** | **F4** | **F5** |
| VCO | 11 | 15 | 14,9 | 14,8 | 14,7 | 14,6 |
| Asam Stearat | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| NaOH 30% | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Gliserin | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| Sukrosa | 7,5 | 10,7 | 10,7 | 10,7 | 10,7 | 10,7 |
| Etanol 96% | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Aquadest | 4,5 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Cocamide DEA | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Propilen glikol | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sari lidah buaya | - | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 |
| Jumlah | 90 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Keterangan :

F0 : Blanko

F1 : Formulasi dengan konsentrasi 30%

F2 : Formulasi dengan konsentrasi 40%

F3 : Formulasi dengan konsentrasi 50%

F4 : Formulasi dengan konsentrasi 60%

F5 : Formulasi dengan konsentrasi 70%

**3.8.2 Prosedur** **Pembuatan Sabun Transparan**

Langkah pertama siapkan terlebih dahulu bahan baku dan bahan tambahan beserta alat-alat yang akan di gunakan untuk pembuatan sabun transparan. Proses pembuatan sabun menggunakan metode hot process. VCO yang telah ditimbang dalam beaker glass dipanaskan di atas waterbath. Masukkan asam stearate, lalu aduk hingga homogen. Kemudian masukkan larutan NaOH 30%. Setelah itu masukkan bahan pendukung lainnya yaitu etanol 96%, gliserin, larutan gula (sukrosa + aquadest yang telah dicairakan terlebih dahulu), cocomide DEA, dan propilen glikol, kemudian masukkan sari lidah buaya aduk hingga seluruh bahan tercampur sempurna. Tambahkan pewangi secukupnya sambil diaduk hingga tercampur semuanya. Kemudian sediaan sabun dituang kedalam cetakan, setelah itu di diamkan selama 1-2 jam pada suhu ruang hingga mengeras. Setelah sabun mengeras kemudian dikemas.

* 1. **Pengujian Terhadap Sabun Transparan**

**3.9.1 Uji Organoleptis**

Pengamatan organoleptis meliputi uji dengan cara memeriksa bentuk, warna dan aroma yang dilakukan pada sabun secara visual(Noviyanto, 2020).

**3.9.2 Uji Kadar Air**

Timbang cawan kosong lalu dicatat. Masukkan 5 g sampel sabun yang telah di rajang masukkan ke cawan penguap yang telah diketahui bobotnya setelah itu masukkan ke dalam oven dengan suhu 1050C selama 2 jam sampai bobot konstan dan timbang cawan berisi lalu catat. Uji kadar dilakukan untuk mengetahui persen kadar air yang terkandung di dalam sabun sehingga kita dapat mengetahui masa penyimpanan pada sabun (Rashati, 2023).

Perhitungan :

Kadar air

Keterangan :

W1 = berat sampel + berat botol timbang, gram

W2 = berat sampel setelah pengeringan, gram

W = berat sampel, gram

**3.9.3 Uji Tinggi Busa**

Timbang sabun sebanyak 1 g, masukkan kedalam tabung reaksi, kemudian masukkan aquadest sebanyak 10 ml, kocok dengan menggunakan vortex selama 1 menit, kemudian diukur tinggi busa dengan menggunakan penggaris. Lalu di diamkan selama 5 menit, dan ukur kembali tinggi busa yang di dapatkan. Uji tinggi busa dilakukan untuk melihat daya busa yang dihasilkan sabun yang dibuat sesuai dengan standar tinggi busa yang ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) yaitu 1,3-22 cm (Noviyanto, 2020).

Perhitungan :

Uji busa = Ho – Hm

Keterangan :

Ho = Tinggi busa mula-mula

Hm = Tinggi busa setelah 5 menit

**3.9.4 Uji pH**

Pengukuran pH dilakukan menggunakan alat pH elektroda agar mendapatkan hasil lebih akurat dengan cara timbang sabun 1 g diencerkan dengan aquadest sebanyak 10 ml kemudian masukkan kedalam larutan tersebut lalu tunggu hingga indicator pH stabil dan menunjukkan nilai pH yang kostan. Uji pH dilakukan untuk mengetahui sediaan sabun yang dibuat sesuai dengan standar pH sabun berdasarkan SNI yaitu 9-11 (Noviyanto, 2020).

**3.9.5 Uji Iritasi**

Uji iritasi dilakukan terhadap 6 orang sukarelawan yang sebelumnyadiberikan surat pernyataan yang menyatakan bahwa bersedia menjadi sukarelawan dan juga diberikan informasi terkait uji iritasi dan bagaimana cara mengatahui adanya iritasi atau tidak. Pengujiannya dilakukan dengan carasediaan sabun dioleskan pada bagian belakang telinga sukarelawan.Kemudian dibiarkan selama 24 jam dan dilihat perubahan yangterjadi. Uji iritasi dilakukan untuk memastikan bahwa sabun tersebut tidak meyebabkan iritasi yang signifikasi pada kulit pengguna seperti kemerahan, gatal, mengalami luka, atau menjadi kering (Wasitaatmaja, 1997).

Kriteria sukarelawan yang dijadikan panelis pada uji iritasi adalah sebagai berikut :

1. Wanita/Pria
2. Usia antara 18 - 30tahun
3. Berbadan sehat jasmani danrohani
4. Tidak memiliki riwayat penyakitalergi
5. Menyatakan kesediaannya untuk dijadikan panulis ujiiritasi.

**3.10 Uji Antibakteri Sediaan Sabun Transparan**

**3.10.1 Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat - alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan kertas perkamen disterilkan menggunakan oven pada suhu 170oC selama 1jam. Alat-alat atau bahan-bahan lainnya seperti media disterilkan di autoklaf pada suhu 121oC selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara fiksasi/dibakar pada lampu bunsen. Sebelum mulai, daerah sekitarpengerjaandisemprotkan denganetanol70%dandibiarkanselama15menit sebelum digunakan. Meja dibersihkan dari debu dan dilap dengan menggunakan desinfektan (Irianto,2006).

**3.10.2 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)**

**Komposisi :**

Beef extract 3 g

Pepton 5 g

Agar 12 g

Aquadest ad 1000 ml

Cara pembuatan :

Ditimbang sebanyak 20 g serbuk NA kemudian disuspensikan dalam erlemayer dengan akuadest yang ditambahkan sedikit demi sedikit hingga 1000 mL, dipanaskan hingga mendidih sambil sesekali diaduk sampai bahan larut sempurna dan jernih.Tutup erlemayer dengan kapas yang dilapisi dengan aluminium foil. Disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121oC tekanan 1 atm selama 15 menit.

**3.10.3 Pembuatan Medi Muller Hiton (MHA)**

**Komposisi :**

Beef infusion 3 g

Pati 1,5 g

Bakto Agar 17 g

Aquadest ad 1000 ml

Cara pembuatan :

Sebanyak 38 g media Mueller Hilton Agar (MHA) dilarutkan kedalam akuadest steril sedikit demi sedikit, kemudian volume dicukupkan hingga 1liter dan dipanaskan sampai terlarut sempurna. Media disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121oC selama 15 menit.

**3.10.4 Pembuatan Agar Miring**

Pembuatan NA yang sudah disiapkan dan disterilkan kemudiaan dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 10 ml, kemudian dimiringkan 30-40 derajat. Bagianmuluttabung reaksi disumbat dengan kapas yang dibalut kain kasa steril, kemudian media yang telahpadatdisimpandalamlemaripendinginpadasuhu5oC,makadiperolehmedia agar miring (Ditjen POM,1995).

**3.10.5 Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %**

**Komposisi :**

Natrium klorida ,9 g

Aquades ad 100 ml

Cara pembuatan :

Sebanyak 0,9 g Natrium Klorida dilarutkan dalam akuades steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 m sampai sempurna. Ditambahkanaquadeststeril sampai garis tanda, dimasukkan dalam erlemeyer steril yangbertutuplaludisterilkanpadaautoklafpadasuhu 121OC selama 15 menit (Ditjen POM,1995).

**3.10.6 Pembuatan Suspensi Bakteri Standar *Mc. Farland***

**Komposisi** :

Larutan asam sulfat 1% v/v 9,5 ml

Larutan bariun klorida 1,175 b/v 0,05 ml

Cara pembuatan :

Kedua larutan dicampurkan dalam labu tentukur 100 mL steril, dikocok sampai homogen dan ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspensi bakteri sama dengan kekeruhan suspensi standar ini maka konsentrasi suspensi bakteri adalah 108CFU/mL (Silaban, 2009).

**3.11Peremajaan Bakteri**

Kolonibakteri*Staphylococcusaureus*diambildaristok kulturdengan menggunakan jarum ose steril, lalu ditanam pada media Nutrient Agar miring dengancaramenggoresnya denganbentukzig-zag.Kemudiandiinkubasipadasuhu 37oC selama 18-24 jam. Koloni yang tumbuh digunakan sebagai bakteri uji pada pengujian daya hambat bahan uji (Ditjen POM,1995).

**3.12 Pembuatan Inokulum**

Stok kultur bakteri yang telah diremajakan pada media NA diambil dengan menggunakan jarum ose steril kemudian disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl 0,9% steril. Kemudian kekeruhan suspensi bakteri yang diperoleh dibandingkan dengan kekeruhan larutan *Mc. Farland* maka konsentrasi bakteri adalah 108 CFU/mL. Selanjutnya dilakukan suspensi dengan cara dipipet 0,1mLsuspensibakteri108CFU/mL,dimasukkandalamtabungreaksiyangberisi 9,9 mL natrium klorida 0,9% steril kocok homogen maka diperoleh suspensi 106 CFU/mL (Fatisa,2013).

**3.13 Pengenceran Sediaan Sabun**

Masing-masing setiap konsentrasi ditimbang 1 g, kemudian dilarutkan dalam 2 ml aquadest setelah encer masukkan kedalam botol vial.

**3.14 Pengujian AktivitasAntibakteri**

Pengujian aktivitas antibakteri sari lidah buaya terhadap *Staphylococcus aureus* ini dilakukan dengan metode difusi sumur terdiri dari 7 perlakuan, yaitu blanko 1, sabun dettol 1, dan 5 konsentrasi sari lidah buaya (30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%) dan kontrol negatif (blanko), kontrol positif (sabun Dettol). Dipipet 0,1 ml suspensi bakteri kedalam cawan petri, ditambahkan media MHA yang telah disterlkan sebanyak 15-20 ml, kemudian digoyang diatas permukaan meja agar media dan suspense tercampur merata, di diamkan hingga memadat. Setelah itu dibuat lubang dengan pencetak (punch hole) dengan diameter 5 mm, setiap cawan petri dibuat 5 sumuran selanjutnya diisi dengan sediaan sabun yang telah diencerkan sebanyak 0,1 ml, kemudian semua cawan petri yang telah berisi perlakuan, selanjutnya di inkubasi kedalam inkubator pada suhu 36-37oC selama 18-24 jam (Marniza, 2019). Zona hambat dihitung dengan cara mengukur diameter horizontal dan diameter vertikal dari zona hambat yang terbentuk. Dilakukan 3 kali pengulangan.

Hasil pengujian aktivitas antibaktri disimpilkan dari luasnya diameter zona hambat pertumbuhan bakteri, semangkin besar zona hambat pertumbuhan, maka semangkin besar aktivitas antibakteri sediaan sabun transparan.

**3.15 Pengukuran dan Penetapan Zona Hambat**

Pengamatan dilakukan setelah 1 × 24 jam masa inkubasi, zona hamat diamati dengan cara mengukur daerah bening (diameter zona hambat) disekitar lubang sumur dengan menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm) (Dewi, 2019).