

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

### **A. Lawar Babi**

Menurut Suter (2009) dalam Purnama, Purnama, dan Subrata (2017), Bali yang terkenal sebagai daerah pariwisata memiliki beraneka makanan dan minuman tradisional yang tersebar di seluruh wilayah Provinsi Bali. Salah satu makanan tradisional yang populer di Bali adalah lawar.

Lawar merupakan sejenis lauk pauk yang dibuat dari campuran daging atau ikan dengan sayur mayur dan bumbu. Jenis-jenis lawar dapat berupa lawar babi, lawar ayam, lawar kambing, lawar sapi, dan lawar bebek (Yusa dan Suter, 2012). Lawar Bali ada dua jenis, yaitu lawar merah yang mengandung darah segar dan lawar putih yang tidak mengandung darah segar. Kandungan gizi yang terdapat di dalam lawar dapat berupa protein, lemak, dan karbohidrat (Ekawati, 2016).

### **B. Sumber Kontaminasi Makanan**

Berdasarkan Undang-undang Pangan No.18 tahun 2012, keamanan pangan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia serta tidak bertentangan dengan agama, keyakinan dan budaya masyarakat sehingga aman untuk dikonsumsi. Cara pengelolaan makanan yang baik yaitu dengan menerapkan prinsip higiene dan sanitasi makanan. Prinsip higiene sanitasi makanan, meliputi (Kementerian Kesehatan RI, 2014):

## **1. Pemilihan bahan makanan**

Pemilihan bahan makanan harus memperhatikan mutu dan kualitas serta memenuhi persyaratan yaitu untuk bahan makanan tidak dikemas harus dalam keadaan segar, tidak busuk, tidak rusak/berjamur, tidak mengandung bahan kimia berbahaya dan beracun serta berasal dari sumber yang resmi atau jelas. Untuk bahan makanan dalam kemasan atau hasil pabrikan, bahan wajib mempunyai label dan merek, komposisi jelas, terdaftar dan tidak kadaluwarsa.

## **2. Penyimpanan bahan makanan**

Penyimpanan bahan makanan baik bahan makanan tidak dikemas maupun dalam kemasan harus memperhatikan tempat penyimpanan, cara penyimpanan, waktu atau lama penyimpanan dan suhu penyimpanan. Selama berada dalam penyimpanan, makanan harus terhindar dari kemungkinan terjadinya kontaminasi oleh bakteri, serangga, tikus dan hewan lainnya serta bahan kimia berbahaya dan beracun. Bahan makanan yang disimpan lebih dahulu atau masa kadaluwarsanya lebih awal dimanfaatkan terlebih dahulu.

## **3. Pengolahan makanan**

Empat aspek higiene sanitasi makanan sangat mempengaruhi proses pengolahan makanan, oleh karena itu harus memenuhi persyaratan, yaitu:

- a. Tempat pengolahan makanan atau dapur, harus memenuhi persyaratan teknis higiene sanitasi untuk mencegah risiko pencemaran terhadap makanan serta dapat mencegah masuknya serangga, binatang pengerat, vektor dan hewan lainnya.
- b. Peralatan yang digunakan harus aman dan tidak berbahaya bagi kesehatan (lapisan permukaan peralatan tidak larut dalam suasana asam/ basa dan tidak

mengeluarkan bahan berbahaya dan beracun) serta peralatan harus utuh, tidak cacat, tidak retak, tidak gompel dan mudah dibersihkan.

- c. Bahan makanan harus memenuhi persyaratan dan diolah sesuai urutan prioritas. Perlakuan terhadap makanan hasil olahan harus sesuai dengan persyaratan higiene dan sanitasi makanan, bebas cemaran fisik, kimia dan bakteriologis.
- d. Penjamah makanan/pengolah makanan berbadan sehat, tidak menderita penyakit menular dan berperilaku hidup bersih dan sehat.

#### **4. Penyimpanan makanan matang**

Penyimpanan makanan yang telah matang harus memperhatikan suhu, pewadahan, tempat penyimpanan dan lama penyimpanan. Penyimpanan pada suhu yang tepat baik suhu dingin, sangat dingin, beku maupun suhu hangat serta lama penyimpanan sangat mempengaruhi kondisi dan cita rasa makanan matang.

#### **5. Pengangkutan makanan**

Dalam pengangkutan baik bahan makanan maupun makanan matang harus memperhatikan beberapa hal yaitu alat angkut yang digunakan, teknik/cara pengangkutan, lama pengangkutan, dan petugas pengangkut. Hal ini untuk menghindari risiko terjadinya pencemaran baik fisik, kimia maupun bakteriologis.

#### **6. Penyajian makanan**

Makanan yang telah masak, ditempatkan pada tempat khusus untuk pemorsian dan kemudian disalurkan dan siap disajikan pada konsumen. Pengawasan higiene dan sanitasi terhadap penyajian makanan meliputi: kebersihan alat-alat, alat pengangkutan serta personal yang mengerjakannya (Marwanti, 2009).

### C. Penyakit Diare

Diare merupakan penyakit yang ditandai dengan konsistensi feses cair atau setengah cair. Diare adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *enterobacteriaceae* yang merupakan kelompok bakteri endogen yang berada di saluran intestinal yang memiliki akses masuk ke dalam saluran pencernaan melalui makanan atau minuman yang telah terkontaminasi (Cappuccino dan Sherman, 2009).

### D. Bakteri *Salmonella species*

*Salmonella sp.* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan salmonellosis, yang dapat ditularkan melalui makanan dengan bahan daging hewan yang terkontaminasi oleh *Salmonella sp.* (*foodborne disease*). Makanan yang kurang sempurna pemasakannya dapat juga sebagai sumber penularan *Salmonella sp.* (Yuswananda, 2015).

#### 1. Morfologi

Bakteri *Salmonella sp.* adalah bakteri yang termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae* yang berbentuk batang, tidak berspora, dan pada pewarnaan gram bakteri ini bersifat gram negatif.



Gambar 1 *Salmonella sp.* Sumber : (Yuswananda, 2015)

Bakteri ini memiliki ukuran 1-3,5  $\mu\text{m}$  x 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  sedangkan besar koloninya rata-rata 2-4 mm. *Salmonella sp.* memiliki flagel peritrik kecuali *Salmonella pullorum* dan *Salmonella gallinarum* (Karsinah, Lucky, dan Mardiasuti, 2010). Bakteri *Salmonella sp.* tumbuh pada suasana aerob dan fakultatif anaerob, pada suhu 15-41  $^{\circ}\text{C}$  (suhu pertumbuhan optimum 37,5  $^{\circ}\text{C}$ ) dan pH pertumbuhan bakteri ini yaitu 6-8 (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012).

Pada umumnya isolat bakteri *Salmonella sp.* memiliki sifat-sifat berupa gerak positif, reaksi fermentasi positif pada manitol dan sorbitol dan fermentasi negatif pada reaksi indol, DNase, fenilalanin deaminase, urease, Voges Proskauer, sukrosa, laktosa, adonitol, serta tidak tumbuh dalam larutan KCN. Sebagian besar isolat *Salmonella* yang berasal dari bahan klinik menghasilkan  $\text{H}_2\text{S}$ . Bakteri *Salmonella sp.* mati pada suhu 56  $^{\circ}\text{C}$  dan pada kondisi kering, di dalam air bakteri ini dapat bertahan selama 4 minggu (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012).

## **2. Struktur antigen**

*Salmonella sp.* memiliki tiga struktur antigen yang meliputi: antigen O, H, dan Vi (Karsinah, Lucky, dan Mardiasuti, 2010).

### **a. Antigen somatik atau antigen O**

Antigen somatic (O) *Salmonella sp.* serupa dengan antigen somatik bakteri *Enterobacteriaceae* lainnya. Antigen ini tahan terhadap pemanasan dengan suhu 100 $^{\circ}\text{C}$ , asam, dan alkohol serta antibodi yang dapat dihasilkan adalah IgM. Antigen ini terdiri dari lipopolisakarida yang dapat dibedakan dalam tiga regio.

- 1) Regio 1: polimer dari unit oligosakarida yang spesifik dengan 3-4 monosakarida yang berulang.
- 2) Regio 2: terdiri dari inti polisakarida dan menempel pada region 1.

3) Regio 3: terdiri dari lipid A yang merupakan bagian molekul yang toksik dan menghubungkan LPS dengan lapisan murein lipoprotein.

b. Antigen flagel atau antigen H

Antigen flagel (H) *Salmonella sp.* terdiri dari protein dan terdapat dalam dua fase yaitu fase spesifik dan fase tidak spesifik. Fase ini terjadi akibat adanya variasi asam amino *reversible*. Antigen flagel tidak tahan pada pemanasan suhu diatas 60°C, alkohol, dan asam serta antibodi yang dibentuk adalah IgG.

c. Antigen kapsul atau antigen Vi

Antigen permukaan (Vi) merupakan polimer dari polisakarida yang bersifat asam dan terdapat dibagian terluar tubuh bakteri. Antigen ini dapat menghalangi atau menghambat reaksi aglutinasi antigen O dengan antiserumnya yang homolog. Antigen Vi merupakan antigen yang virulen dan berperan dalam patogenesis penyakit demam tifoid. Antigen ini dapat rusak dengan pemanasan 60°C selama 1 jam, penambahan fenol, dan asam.

### 3. Patogenitas

Salmonellosis adalah istilah yang menunjukkan adanya infeksi oleh kuman *Salmonella sp.* Pada manusia, salmonellosis memiliki manifestasi klinis, seperti: gastroenteritis, demam tifoid, bakteremia, dan karier yang asimtomatik. Terjadinya enteritis atau sekresi cairan usus dan diare diakibatkan oleh adanya strain-strain *Salmonella* yang menginvasi lapisan epitel ileum (Karsinah, Lucky, dan Mardiastuti, 2010).

Salmonellosis adalah infeksi yang disebabkan oleh *Salmonella* yang masuk melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi. Orang yang terinfeksi akan mengalami gejala demam, diare, kram perut, pusing, sakit kepala,

dan rasa mual setelah 12 - 72 jam terinfeksi. Virulensi bakteri *Salmonella* disebabkan oleh beberapa hal, yang meliputi (Radji, 2016) :

- a. *Salmonella* memiliki kemampuan menginvasi sel-sel epitel.
- b. Memiliki antigen permukaan yang terdiri dari simpai lipopolisakarida.
- c. Memiliki kemampuan melakukan replikasi interseluler.
- d. Mampu menghasilkan beberapa toksin spesifik.
- e. Memiliki kemampuan berkolonisasi pada ileum, kolon, dan lapisan epitel intestine serta berkembang di dalam sel-sel limfoid.

#### **4. Kelompok *Salmonella sp.***

Bakteri *Salmonella sp.* merupakan bakteri yang terdiri dari dua spesies yaitu *Salmonella enteric* dan *Salmonella bongori*. Terdapat lebih dari 2500 serotipe *Salmonella* dan terdapat empat serotipe *Salmonella* yang menyebabkan demam enterik yang dapat diidentifikasi di laboratorium yang meliputi (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012):

- a. *Salmonella paratyphi A* dan *Salmonella paratyphi B*

*Salmonella paratyphi A* dan *Salmonella paratyphi B* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit demam paratifoid dan salmonella bacteremia. Demam paratifoid termasuk demam enterik sedangkan salmonella bacteremia merupakan penyakit yang terjadi setelah mengalami infeksi oral kemudian infeksi menuju kealiran darah yang disertai lesi lokal di paru, meningen dan sebagainya (Yuswananda, 2015).

Pada uji Biokimia, bakteri *Salmonella paratyphi* akan menunjukkan hasil positif uji TSIA, uji Metil Red, uji Indol, uji Motility, uji Urease, Simon citrate,

dan positif pada semua uji gula-gula. Sedangkan hasil negatif ditemukan pada uji Voges Proskauer (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012).

b. *Salmonella choleraesuis*

*Salmonella choleraesuis* merupakan bakteri spesies *Salmonella* yang dapat sebabkan penyakit salmonella bacteremia yaitu infeksi bakteri yang diawali dengan adanya infeksi oral yang kemudian berlanjut menuju aliran darah yang disertai dengan lesi lokal pada paru, meningen, dan sebagainya (Yuswananda, 2015).

Pada uji Biokimia, *Salmonella choleraesuis* akan menunjukkan hasil positif pada uji TSIA, uji Metil Red, uji Motility, Simon citrate, dan positif memfermentasi gula glukosa dan manitol. Sedangkan hasil negatif ditemukan pada uji Voges Proskauer, Urease, Indol, uji fermentasi gula laktosa dan sukrosa (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012).

c. *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* adalah kuman patogen yang menjadi penyebab penyakit demam tifoid yang merupakan suatu penyakit infeksi sistemik dengan gejala klinis berupa demam yang berlangsung lama, adanya bakteremia disertai inflamasi yang dapat merusak usus dan organ-organ hati (Yuswananda, 2015).

*Salmonella typhi* merupakan kuman batang gram negatif, yang tidak memiliki spora, bergerak dengan flagel peritrik, bersifat intraseluler fakultatif dan anerob fakultatif. Ukuran dari bakteri ini yaitu berkisar antara 0,7-1,5 x 2-5  $\mu\text{m}$ , memiliki antigen somatik (O), antigen flagel (H) dengan 2 fase serta antigen kapsul (Vi) (Cita, 2011).



Bakteri *Salmonella typhi* pada uji Biokimia akan menunjukkan hasil positif pada uji TSIA, uji Metil Red, uji Motility, dan positif memfermentasi gula glukosa tanpa menghasilkan gas, gula laktosa dan manitol. Sedangkan hasil negatif ditemukan pada uji Voges Proskauer, Simon citrate, Urease, Indol, dan uji fermentasi gula sukrosa (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012).

## **5. Dampak infeksi *Salmonella sp.***

### **a. Gastroenteritis**

Sering juga disebut dengan keracunan makanan, yang mana pada usus tidak ditemukan toksin tetapi menimbulkan gejala pertama seperti: mual dan muntah yang mereda beberapa jam, kemudian diikuti dengan nyeri pada perut serta demam. Masa inkubasi penyakit ini berkisar antara 12 - 48 jam. Diare adalah gejala yang paling menonjol dari keracunan makanan, kasus berat diare dapat memunculkan gejala berupa diare yang disertai dengan darah. Penderita sering sembuh dengan sendirinya dalam waktu 1-5 hari, tetapi kadang jadi berat karena terjadi gangguan keseimbangan elektrolit dan dehidrasi. Penyebab gastroenteritis adalah *Salmonella enteritidis serotip thypimurium* (Karsinah, Lucky, dan Mardiasuti, 2010).

### **b. Demam tifoid**

Demam tifoid merupakan penyakit yang terjadi akibat infeksi bakteri *Salmonella typhi*. Penyakit ini juga dapat disebabkan oleh bakteri *Salmonella enteritidis bioserotip paratyphi A* dan *Salmonella enteritidis bioserotip paratyphi B*. Masa inkubasi demam tifoid umumnya 1-2 minggu, dapat lebih singkat yaitu 3 hari atau lebih panjang hingga 2 bulan. Gejala dari penyakit ini, meliputi: demam tinggi pada minggu kedua dan ketiga sakit, biasanya 4 minggu gejala akan hilang.

Gejala lainnya seperti: anoreksia, malaise, nyeri otot, sakit kepala, batuk dan konstipasi. Selain itu juga dapat ditemukan adanya pembesaran hati dan limpa, bintik *rose* sekitar umbilikus (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012).

## 6. Identifikasi *Salmonella sp.*

Berbagai cara identifikasi bakteri *Salmonella sp.* telah dikembangkan, tetapi analisis konvensional yang masih banyak dikerjakan adalah uji bakteriologi untuk isolasi *Salmonella sp.* yang meliputi beberapa tahap yaitu: kultur pada media selektif dengan media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), serta uji identifikasi dengan melakukan reaksi biokimia dan uji aglutinasi slide dengan sera yang spesifik (Jawetz, Melnick, and Adelberg's, 2012).

### a. Kultur pada media *Salmonella Shigella Agar*

*Salmonella Shigella Agar* (SSA) adalah media diferensial dan media selektif yang berbentuk padat yang digunakan untuk mengisolasi kuman *Salmonella sp.* dan *Shigella sp.* *Salmonella Shigella Agar* (SSA) mengandung ekstrak daging sapi 5 gram, laktosa 10 gram, bile salt 8,5 gram, sodium citrate 8,5 gram, brilliant green 0,33 mg, ferric citrate 1 gram, neutral red 0,025 gram, dan agar 13,5 gram. Media ini tersusun dari beberapa macam bahan yaitu campuran ekstrak daging dan pepton menyediakan kebutuhan nitrogen, vitamin, mineral, dan asam amino diperlukan untuk pertumbuhan. Ferric citrate mendeteksi adanya H<sub>2</sub>S yang dihasilkan oleh bakteri sehingga akan terbentuk koloni dengan titik hitam ditengah (Cappuccino dan Sherman, 2009).

### b. Uji TSIA/Triple Sugar-Iron Agar

Uji TSIA merupakan suatu uji yang dirancang untuk membedakan antar kelompok atau antar genus yang berbeda dalam *Enterobacteriaceae* yang

seluruhnya merupakan basilus gram negatif yang dapat memfermentasi glukosa dengan disertai pembentukan asam. Uji TSIA dilakukan berdasarkan perbedaan pola fermentasi karbohidrat dan pembentukan hidrogen sulfida oleh berbagai kelompok organisme intestinal. Untuk mempermudah pengamatan pola fermentasi karbohidrat, agar miring TSIA mengandung laktosa, sukrosa 1%, dan glukosa 0,1% serta penambahan indikator asam basa *fenol red* untuk mendeteksi fermentasi karbohidrat (Cappuccino dan Sherman, 2009).

- 1) Permukaan miring basa (merah) dan bagian dasar asam (kuning) dengan atau tanpa pembentukan gas (pecah pada dasar agar), menandakan terjadinya fermentasi glukosa dan menghasilkan asam dalam jumlah kecil pada permukaan miring yang teroksidasi secara cepat ke bagian dasar. Reaksi asam tersebut dipertahankan karena berkurangnya tekanan oksigen dan pertumbuhan organisme lebih lambat. Pepton di dalam media digunakan untuk membentuk basa pada bagian permukaan miring.
- 2) Permukaan miring asam (kuning) dan bagian dasar asam (kuning) dengan atau tanpa pembentukan gas, menandakan terjadinya fermentasi sukrosa dan laktosa. Substrat dalam konsentrasi yang lebih tinggi mampu memfermentasi kedua senyawa tersebut yang berperan dalam mempertahankan reaksi asam baik pada permukaan miring maupun pada dasar tabung.
- 3) Permukaan miring basa (merah) dan bagian dasar basa (merah) atau tidak berubah (merah-jingga), menandakan tidak terjadi fermentasi karbohidrat. Penguraian pepton dalam kondisi aerob/anaerob menghasilkan pH basa akibat pembentukan ammonia. Penguraian pepton pada kondisi aerob akan memperlihatkan reaksi basa pada permukaan miring, sedangkan apabila

penguraian pepton terjadi secara aerob dan anaerob maka reaksi basa akan terlihat pada permukaan miring dan dasar tabung.

c. Uji IMVIC

Uji IMVIC merupakan suatu uji yang dilakukan untuk membedakan kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* berdasarkan sifat biokimia dan reaksi enzimatik bakteri-bakteri tersebut. Uji IMVIC ini meliputi uji *indol*, *metil merah*, *Voges-Proskauer*, dan *Simon citrate* (Cappuccino dan Sherman, 2009).

1) Uji *indol*

Prinsip dari uji ini adalah kemampuan dalam menghidrolisis *triptofan* menjadi produk-produk metabolik dimediasi oleh enzim *triptofanase* yang disertai dengan produksi indol dideteksi dengan penambahan pereaksi *Kovac* yang ditandai dengan terbentuknya lapisan berwarna merah ceri (Cappuccino dan Sherman, 2009).

2) Uji MR-VP

Pengujian ini dilakukan untuk membedakan bakteri-bakteri yang menghasilkan produk akhir berupa asam (MR) atau non-asam (VP) setelah memfermentasi glukosa. Penggunaan indikator *metil merah* bertujuan untuk mendeteksi terbentuknya produk akhir berupa asam berkonsentrasi tinggi. Sedangkan penggunaan pereaksi *Barrit* pada uji VP bertujuan untuk menentukan kemampuan beberapa organisme yang membentuk produk akhir non-asam atau netral (Cappuccino dan Sherman, 2009).

3) Uji *Simon citrate*

Uji *citrate* merupakan suatu uji yang dilakukan untuk mengenali organisme yang menggunakan sitrat sebagai sumber karbon untuk mendapatkan

energi. Transport sitrat ke dalam sel difasilitasi oleh sitrat permease, selama reaksi berlangsung media akan menjadi basa dikarenakan karbondioksida yang dihasilkan bergabung dengan natrium dan air membentuk natrium karbonat. Adanya natrium karbonat mengubah indikator *bromtimol blue* yang ditambahkan ke dalam media dari hijau menjadi biru prusia tua (Cappuccino dan Sherman, 2009).

d. Uji Urease

Uji ini bertujuan untuk menentukan kemampuan bakteri dalam menguraikan urea oleh enzim urease. Prinsip dari uji urease adalah urease adalah enzim hidrolitik yang mampu memecah senyawa amida seperti urea menjadi ammonia dan asam karbonat yang bersifat basa. Suasana basa ini mampu menyebabkan perubahan warna pada indikator *fenol red* menjadi warna merah muda (Radji, 2016).

e. Uji gula-gula

Uji gula-gula merupakan uji yang menggunakan gula sukrosa, manitol, laktosa, dan glukosa. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan fermentasi bakteri terhadap karbohidrat. Prinsip dari uji gula-gula yaitu bakteri menggunakan karbohidrat secara berbeda-beda tergantung pada komplemen enzim yang dihasilkan. Fermentasi tersebut akan menghasilkan produk berupa asam-asam organik seperti asam laktat, asam format, atau asam asetat yang kemungkinan disertai dengan pembentukan gas seperti hidrogen atau karbondioksida (Ummamie dkk., 2017).

## **E. Angka Lempeng Total**

Menurut SNI 7388 tahun 2009, Angka lempeng total (ALT) merupakan jumlah mikroba aerob mesofilik per gram atau per milliliter contoh yang ditentukan melalui metode standar (SNI 7388, 2009). Pada uji angka lempeng total, metode yang sering digunakan, yaitu hitung cawan. Prinsip dari metode hitung cawan adalah sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, kemudian sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop (Radji, 2016).

Kelebihan dari penggunaan metode hitung cawan yaitu sensitif untuk menghitung jumlah mikroba dikarenakan hanya sel yang masih hidup yang dihitung, beberapa jenis mikroba dapat dihitung sekaligus, serta dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari mikroba yang mempunyai penampakan spesifik (Waluyo, 2016).

Sedangkan kekurangan dari penggunaan metode hitung cawan meliputi (Cappuccino dan Sherman, 2009):

- a. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel mikroba yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
- b. Medium dan kondisi inkubasi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda pula.
- c. Mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.
- d. Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi beberapa hari sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.

- e. Memerlukan inkubasi selama 24 jam sebelum koloni-koloni terbentuk pada permukaan agar.
- f. Menggunakan peralatan gelas yang lebih banyak untuk melakukan teknik ini serta prosedur yang lebih banyak dapat menimbulkan kesalahan penghitungan akibat kesalahan pada pengenceran.

Metode hitung cawan dapat dibedakan atas dua cara, yaitu metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan (*surface/spread plate*).

a. Metode sebar (*spread plate*)

Metode ini biasanya digunakan untuk memisahkan mikroorganisme yang terkandung dalam volume sampel kecil, sehingga menghasilkan pembentukan koloni diskrit yang didistribusikan secara merata di seluruh permukaan. Selain itu, dapat mempermudah menghitung jumlah koloni yang tumbuh (Sanders, 2012).

b. Metode tuang (*pour plate*)

Metode ini sering digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme dalam sampel campuran, yang ditambahkan ke media agar cair sebelum media memadat. Proses ini menghasilkan koloni yang tersebar merata di seluruh medium padat (Sanders, 2012).

