

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Obat Tradisional

Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat (DepKes RI, 2012).

Dalam Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional dikatakan bahwa persyaratan mutu untuk cairan obat dalam yaitu cemaran mikroba seperti  $ALT \leq 10^7$  koloni/g dan mikroba patogen (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*) negatif. Mikroba patogen adalah semua mikroba yang dapat menyebabkan penyakit bila masuk ke dalam tubuh seseorang. Mikroba patogen yang perlu diwaspadai dalam cairan obat dalam yaitu *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Cairan obat dalam tidak boleh mengandung bakteri patogen karena sangat berbahaya yaitu dapat menyebabkan infeksi penyakit. Persyaratan obat tradisional yang baik bertujuan untuk melindungi konsumen dan menjaga mutu obat tradisional itu sendiri (DepKes RI, 2012).

Obat tradisional yang dapat diberikan izin edar harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

1. Menggunakan bahan yang memenuhi persyaratan keamanan dan mutu;

2. Dibuat dengan menerapkan CPOTB (Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik);
3. Memenuhi persyaratan farmakope herbal Indonesia atau persyaratan lain yang diakui;
4. Berkhasiat yang dibuktikan secara empiris, turun temurun, dan/atau secara ilmiah; dan
5. Penandaan berisi informasi yang objektif, lengkap, dan tidak menyesatkan (DepKes RI, 2012).

Dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 007 tentang Registrasi Obat Tradisional pasal 4 ayat 1 dikatakan bahwa obat tradisional yang dibuat oleh usaha jamu racikan dan jamu gendong tidak memerlukan izin edar. Jamu kunyit asam yang diproduksi oleh penjual jamu gendong keliling memang tidak memerlukan ijin edar, namun kualitas jamu ini tetap harus terjamin kebersihan dan proses pembuatannya sehingga aman untuk dikonsumsi (DepKes RI, 2012).

## **B. Jamu Kunyit Asam**



Gambar 1 Jamu Kunyit Asam  
Sumber: Alodokter.com

Jamu merupakan obat tradisional yang dikenal masyarakat di Jawa sejak jaman dahulu, bahkan sudah menyebar ke beberapa daerah di luar pulau Jawa. Jamu disediakan dalam bentuk cairan (minuman) dan merupakan ramuan dari beberapa bahan yang biasanya masih segar. Jamu dibuat dengan cara sederhana dan merupakan sediaan obat yang tidak dapat disimpan lama dan biasanya diminum dalam keadaan segar. Salah satu jamu yang diminum dalam keadaan segar adalah jamu kunyit asam. Jamu kunyit asam disebut juga jamu segar-segaran yang digunakan untuk menyegarkan tubuh. Jamu kunyit asam bermanfaat untuk mengatasi panas dalam, sariawan, dan membuat perut menjadi dingin. Bahan baku jamu kunyit asam adalah kunyit dan buah asam masak. Gula jawa digunakan sebagai pemanis. Secara alamiah memang kunyit dipercaya memiliki kandungan bahan aktif yang dapat berfungsi sebagai analgetika, antipiretika, dan antiinflamasi. Begitu juga asam (asam jawa) yang memiliki bahan aktif sebagai laksatif (memudahkan buang air besar) (Thearesti, 2015).

## **1. Rimpang kunyit**

### **a. Deskripsi tanaman kunyit**



Gambar 2 Kunyit (*Curcuma longa L*)

Sumber: Cairofood.com

Kunyit merupakan tanaman yang tergolong dalam kelompok jahe-jahean dengan warna yang khas yaitu kuning. Tanaman ini berbatang basah dengan batang berwarna hijau atau keunguan, tinggi batangnya sampai 0,75 m, berdaun empat

sampai delapan helai dan berbentuk lonjong, bunga majemuk berwarna merah atau merah muda. Bunga kunyit berwarna coklat dan di tengahnya berwarna kemerah-merahan dan kuning (Thearesti, 2015).

Kunyit menghasilkan umbi utama berbentuk rimpang berwarna kuning tua atau jingga terang. Keseluruhan rimpang membentuk rumpun yang rapat, berwarna oranye dan tunas mudanya berwarna putih. Akar serabut kunyit berwarna coklat muda. Bagian tanaman yang digunakan adalah rimpang atau akarnya (Thearesti, 2015).

#### **b. Taksonomi kunyit**

Berikut taksonomi tumbuhan kunyit (*Curcuma domestica*) (Thearesti, 2015):

*Kingdom* : *Plantae*

*Divisio* : *Spermatophyta*

*Sub-divisio* : *Angiospermae*

*Kelas* : *Monocotyledoneae*

*Ordo* : *Zingiberales*

*Famili* : *Zingiberaceae*

*Genus* : *Curcuma*

*Species* : *Curcuma domestica* Val. atau *Curcuma longa* L.

#### **c. Kandungan kunyit**

Kunyit mengandung protein (6,3%), lemak (5,1%), mineral (3,5%), karbohidrat (69,4%), dan moisture (13,1%). Terdapat minyak esensial (5,8%) yang diperoleh melalui distilasi uap dari rhizome/rimpang tanaman kunyit yang mengandung phellandrene (1%), sabinene (0,6%), cineol (1%), borneol (0,5%), zingiberene (25%) dan sesquiterpenes (53%). Curcumin (diferuloylmethane) (3–

4%) membuat warna rhizoma kunyit menjadi kuning dan terdiri dari curcumin I (94%), curcumin II (6%) dan curcumin III (0.3%). Derivat dari curcumin berupa demethoxy, bisdemethoxy, dan curcumenol juga diperoleh melalui distilasi uap rhizomanya (Thearesti, 2015).

#### **d. Manfaat kunyit**

Secara umum rimpang kunyit digunakan sebagai pewarna masakan dan minuman, bumbu dapur, untuk kecantikan seperti lulur dan kosmetik, serta penambah nafsu makan untuk anak. Pada bidang kesehatan kunyit mempunyai peran sebagai antioksidan, antitumor, antikanker, antimikroba, antipikun, dan antiracun. Secara tradisional kunyit juga dimanfaatkan untuk penyakit diabetes melitus, demam tifoid, apendisitis, disentri, leukorea, haid tidak lancar, dismenore, obat luka, diare, sakit perut, melancarkan peredaran darah, sakit maag, hepatitis, sariawan, rematik, dan dapat menurunkan kolesterol (Thearesti, 2015).

## **2. Asam jawa**

### **a. Deskripsi tanaman asam jawa**



Gambar 3 Asam Jawa  
Sumber: alodokter.com

Asam jawa merupakan tumbuhan yang daunnya bersirip genap dan berbuah polong. Batang pohonnya dapat tumbuh menjadi besar dan daunnya rindang. Daun asam jawa panjang tangkainya sekitar 17 cm dengan sirip genap. Memiliki bunga berwarna kuning kemerah-merahan. Buah polongnya berwarna coklat dengan rasa

khas asam. Di dalam buah polong terdapat biji berjumlah 2-5 yang berbentuk pipih dengan warna coklat kehitaman. Selain itu terdapat kulit yang membungkus daging buah polong ini. Daging buah berwarna putih kehijauan ketika muda, saat sudah masak menjadi merah kecoklatan sampai kehitaman, asam manis dan melengket. Biji berwarna coklat kehitaman, mengkilap dan keras, agak persegi (Thearesti, 2015).

#### **b. Taksonomi asam jawa**

Berikut adalah taksonomi tumbuhan asam jawa (Thearesti, 2015):

*Kingdom* : *Plantae*

*Divisio* : *Magnoliophyta*

*Kelas* : *Magnoliopsida*

*Ordo* : *Fabales*

*Famili* : *Fabaceae*

*Subfamili* : *Caesalpinioideae*

*Genus* : *Tamarindus*

*Species* : *Tamarindus indica L.*

#### **c. Kandungan asam jawa**

Kandungan yang terdapat pada asam jawa cukup banyak, diantaranya yaitu kandungan tanin, saponin, seskuioterpen, alkaloid, dan flobatamin. Selain itu daging buah asam jawa ini juga memiliki berbagai kandungan asam, seperti asam tartrat, asam malat, asam sitrat, asam suksinat, dan asam asetat. Kandungan asam tersebut mempunyai khasiat sebagai laksatif (melancarkan buang air besar), melancarkan peredaran darah, dan mendinginkan. Selain itu pada buahnya juga terdapat

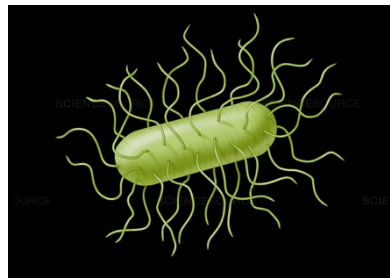
kandungan kimia berupa vitamin A, zat gula, selulosa, dan pectin. Sedangkan kandungan pada daun asam jawa mengandung flavonoid (Thearesti, 2015).

#### **d. Manfaat asam jawa**

Asam jawa dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional yang dipercaya untuk penyakit asma, batuk, demam, rematik, sakit perut, alergi, sariawan, obat luka, bisul, bengkak disengat lebah, gigitan ular berbisa, rambut rontok, jerawat, keputihan, dan juga nyeri haid, daging buah asam jawa dapat dimanfaatkan untuk melancarkan peredaran darah, mendinginkan, dan berkhasiat sebagai laksatif (melancarkan buang air besar). Selain itu daun asam jawa juga dapat menghilangkan rasa sakit karena mengandung flavonoid, sebagai antiradang dan diaforetik (membantu mengeluarkan keringat) (Thearesti, 2015).

### **C. *Escherichia coli***

#### **1. Deskripsi bakteri *Escherichia coli***



Gambar 4 Bakteri *Escherichia coli*  
Sumber: Sciencesource.com

*Escherichia coli* termasuk famili *Enterobacteriaceae* yang merupakan gram negatif, berbentuk batang pendek dan memiliki flagel. Beberapa galur bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi pada manusia seperti infeksi saluran kemih, infeksi meningitis, diare disertai darah, kejang perut, demam, dan terkadang dapat menyebabkan gangguan pada ginjal (Radji, 2009). *Escherichia coli* dapat

tumbuh baik pada temperature 8°C-46°C. Bakteri yang berada sedikit di atas temperature minimum atau sedikit diatas temperatur maksimum, tidak akan mati melainkan berada dalam keadaan tidur (Melliawati, 2009).

## 2. Taksonomi bakteri *Escherichia coli*

Adapun taksonmi dari bakteri *Escherichia coli* yaitu (Ramadhan, 2009) :

*Kingdom* : *Bacteria*  
*Filum* : *Proterobacteria*  
*Kelas* : *Gamma Proteobacteria*  
*Ordo* : *Enterobacteriales*  
*Family* : *Enterobacteriaceae*  
*Genus* : *Escherichia*  
*Species* : *Escherichia coli*

## 3. Morfologi

*Escherichia coli* termasuk kedalam family *Enterobacteriaceaea*. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif memiliki flagel dan memiliki simpai (Radji, 2009). Dengan bentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 µm, diameter 0,7 µm, lebar 0,4-0,7 µm dan bersifat *anaerob fakultatif*. *Escherichia coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 2010).

## 4. Patogenesis

Hampir semua hewan berdarah panas dapat dikoloniasi oleh *Escherichia coli* hanya dalam beberapa jam atau beberapa hari setelah dilahirkan. Kolonisasi *Escherichia coli* dalam saluran cerna manusia biasanya setelah 40 hari dilahirkan. *Escherichia coli* dapat melekat pada usus besar dan dapat bertahan selama beberapa



bulan bahkan beberapa tahun. Perubahan populasi bakteri *Escherichia coli* terjadi dalam periode yang lama, hal ini dapat terjadi setelah infeksi usus atau setelah penggunaan kemoterapi atau antimikroba yang dapat membunuh florainormal (Radji, 2009).

Sebagai besar penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Escherichia coli* ditularkan melalui makan yang tidak dimasak dan daging yang terkontaminasi. Penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi ditempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih (Radji, 2009).

#### **5. Kelompok galur *Escherichia coli***

*Escherichia coli* merupakan bakteri indikator kualitas air minum karena keberadaannya di dalam air mengindikasikan bahwa air tersebut terkontaminasi oleh feses, yang kemungkinan juga mengandung mikroorganisme enteric patogen lainnya (Zakki, 2015). Berdasarkan sifat virulensi, *Escherichia coli* dikelompokkan menjadi dua yaitu *Escherichia coli* yang menyebabkan infeksi intestin dan *Escherichia coli* yang menyebabkan infeksi ekstraintestin. *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan infeksi intestin, sebagai berikut:

##### **a. *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC)**

EPEC menyebabkan diare berair yang parah terutama pada bayi dan anak, dapat bertahan lebih dari 2 minggu dalam tubuh inang serta mengakibatkan kematian jika terjadi dehidrasi berat. Penyakit ini ditandai dengan diare infantil, demam, mual dan muntah. Bakteri ini menginfeksi pada usus kecil. Inkubasi berlangsung selama 12 jam hingga 3 hari, gejala dapat timbul 18-48 jam setelah menyantap makanan yang tercemar bakteri jenis ini (Arisman, 2008).

**b. *Escherichia coli enterotoksigenik (ETEC)***

ETEC menghasilkan dua jenis toksin yang bersifat stabil dan agak labil terhadap panas dan menyebabkan diare pada anak serta bayi, yaitu penyakit yang mirip dengan kolera. Penyakit ini ditandai dengan tinja berair, kram perut, mual, subfebris. Bakteri jenis ini biasanya menginfeksi di usus kecil dengan periode inkubasi ETEC berkisar 1-2 hari, kemudian berlanjut dengan timbulnya diare yang berair tanpa disertai darah ataupun lendir. Penyakit ini bersifat *self-limited*, biasanya gejala ini akan lenyap sendiri dalam kurun waktu kurang dari 5 hari (Arisman, 2008).

**c. *Escherichia coli enteroinvasif (EIEC)***

EIEC menginvasi dan berpoliferasi di dalam sel epitel mukosa sehingga tidak jarang menimbulkan *colonic epithelial cell death*. EIEC dapat menginvasi sel-sel epitel mukosa usus sehingga menyebabkan terjadinya diare berair, disentri, demam, muntah, kram dan nyeri perut hebat, tinja kerap mengandung darah. Penyakit ini terjadi 8-24 jam setelah konsumsi makanan atau air yang tercemar (Arisman, 2008).

**d. *Escherichia coli enterohemoragik (EHEC)***

Gejala yang ditimbulkan EHEC berkisar dari diare berair ringan hingga *colitis hemoragik* yang parah. Setelah masa inkubasi 1-5 hari dilalui, maka terjadi diare berair yang kerap diikuti dengan kram perut serta muntah. Diare berdarah biasanya muncul 1-2 hari setelah gejala pertama muncul dan demam sering terjadi selama 4-10 hari. Mikroorganisme ini mampu mengeluarkan verotoksin yang menyebabkan dua macam sindrom yaitu, hemoragik colitis dan HUS (*Hemolytic Uremic Syndrome*) yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian 3-5% penderitanya gagal ginjal kronis (Arisman, 2008).

**e. *Escherichia coli enteroagregatif (EAEC)***

Menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang. Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatannya pada sel manusia. EAEC diperkirakan memproduksi EAST (*entero aggregative ST toksin*), yang merupakan suatu enterotoksin yang tidak tahan panas. EAEC memproduksi hemolisin dan ST enterotoksin yang sama dengan ETEC (Zakki, 2015).

*Escherichia coli* yang menyebabkan infeksi ekstraintestinal, sebagai berikut:

**a. *Escherichia coli uropatogenik (UPEC)***

UPEC menyebabkan kira-kira 90% infeksi saluran kandung kemih mulai dari sistitis sampai pielonefritis. Bakteri yang berkolonisasi berasal dari tinja atau daerah perineum saluran urine yang masuk ke dalam kandung kemih. Protein penting adhesin yang dikaitkan dengan patogenisitas UPEC adalah P-fimbria atau PAP (pili yang menyebabkan *pielonefritis*). P-fimbria dapat berikatan dengan antigen P yang terdapat pada sel darah merah yang mengandung residu D-galaktosa. Fimbria ini tidak hanya dapat berikatan dengan sel darah merah, tetapi juga berikatan dengan senyawa galaktosa yang terdapat pada permukaan sel-sel epitel saluran kemih. Bakteri ini juga menghasilkan hemolisin yang bersifat sitotoksik terhadap membran sel hospes. Aktivitas hemolisin tidak hanya terbatas pada kemampuan melisis sel darah merah, tetapi  $\alpha$ -hemolisin *Escherichia coli* dapat melisis limfosit, sedangkan  $\beta$ -hemolisin dapat menghambat aktivitas fagositosis dan kemotaksis neutrophil (Arisman, 2008).

**b. *Escherichia coli meningitis neonatus (NMEC)***

NMEC dapat menyebabkan meningitis pada bayi baru lahir. Galur bakteri ini dapat menginfeksi 1 dalam 2000-4000 bayi. Perjalanan infeksi biasanya terjadi

setelah *Escherichia coli* masuk ke dalam pembuluh darah melalui nasofaring atau saluran gastrointestinal dan kemudian masuk ke dalam sel-sel otak. Antigen kapsul KI dianggap sebagai faktor virulensi utama yang menyebabkan meningitis pada bayi. Antigen KI dapat menghambat fagositosis, reaksi komplemen, dan respons reaksi imunitas hospes (Arisman, 2008).

## **6. Identifikasi *Escherichia coli***

Kualitas air dapat diuji dengan beberapa cara, yaitu secara fisika, kimia, dan biologi. Secara biologi, kualitas air dapat diuji berdasarkan ada tidaknya organisme, yaitu bakteri yang hidup di dalamnya. Salah satu metode untuk pengujian kuantitas bakteri dalam air adalah metode *Most Probable Number* (MPN). Pada metode MPN, akan dilakukan prosedur yang terdiri dari tiga tahapan, yaitu uji pendugaan, uji penegas (*confirmed test*), dan uji pelengkap (*complete test*).

Standar analisa air untuk mengetahui adanya bakteri *Coliform* melalui 2 tahapan uji yaitu (Jiwintarum, Agrijanti dan Septiana, 2017):

### **a. Uji penduga (*presumptive test*)**

Bertujuan untuk menduga adanya bakteri *coli* yang mempunyai sifat mampu memfermentasikan laktosa dengan menghasilkan gas. Bakteri *coli* yang diduga meliputi semua bakteri gram negatif yang tidak membentuk spora, selnya membentuk sel pendek, bersifat *fakultatif anaerob*, membentuk gas dalam waktu 24 jam dari laktosa pada temperatur 37° Celsius. Apabila terbentuk gas dalam waktu 24 jam kedua (48 jam) uji dinyatakan meragukan. Sedangkan apabila gas tidak terbentuk dalam waktu 48 jam uji dinyatakan negatif. Apabila hasil uji duga negatif, maka uji-uji berikutnya tidak perlu dilakukan karena dalam

hal ini berarti tidak ada bakteri *coli* dalam sampel (Jiwintarum, Agrijanti dan Septiana, 2017).

Untuk analisis air dalam uji penduga digunakan lactose broth, sedangkan untuk sampel lainnya yang banyak mengandung bakteri asam laktat, misalnya susu digunakan *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB). Bakteri asam laktat dapat memfermentasi laktosa dan membentuk gas, hingga dapat mengakibatkan pembacaan uji positif yang salah. BGLB merupakan medium selektif yang mengandung asam bile sehingga dapat menghambat bakteri gram positif termasuk *Coliform*. Inkubasi dilakukan pada suhu 35° C selama 24-48 jam dan tabung dinyatakan positif bila terbentuk gas sebanyak 10 % atau lebih dari volume di dalam tabung Durham. Tabung yang tidak menunjukkan terbentuknya gas diperpanjang lagi inkubasinya hingga 48 jam. Jika tetap tidak terbentuk gas, di hitung sebagai tabung negatif. Jumlah tabung yang positif di hitung pada masing-masing seri. MPN penduga dapat di hitung dengan melihat table MPN 7 tabung (Jiwintarum, Agrijanti dan Septiana, 2017).

#### **b. Uji penetapan (confirmed test)**

Bertujuan untuk menegaskan hasil positif dari test perkiraan media yang secara umum digunakan adalah Brilliant Green Lactose Broth (BGLB 2%) atau bisa juga menggunakan media selektif dan diferensial untuk bakteri coli seperti misal Endo Agar (EA). Pembacaan dilakukan dengan melihat 24-48 jam dengan melihat tabung-tabung yang positif. Test ini merupakan test yang minimal harus dikerjakan untuk pemeriksaan bakteriologis air. Terbentuknya gas dalam lactose broth atau dalam BGLB tidak selalu menunjukkan bakteri coli karena mikroba lainnya mungkin juga ada yang dapat memfermentasikan laktosa dengan

membentuk gas, misalnya bakteri asam laktat dan beberapa khamir tertentu. Oleh karena itu perlu di lakukan uji penguat pada agar EMB. Dengan Menggunakan jarum ose, sampel dari tabung MPN yang menunjukkan uji penduga positif (terbentuk gas) masing-masing di inokulasikan pada agar cawan EMB dengan cara goresan kuadran. Semua tabung di inkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam. Jumlah cawan EMB pada masing-masing pengenceran yang menunjukkan adanya pertumbuhan Coliform, baik fecal maupun non fecal, dihitung, dan MPN penguat dapat di hitung dari table MPN. (Jiwintarum, Agrijanti dan Septiana, 2017).

#### **D. Angka Lempeng Total (ALT)**

Angka Lempeng Total (ALT) adalah angka yang menunjukkan jumlah bakteri mesofil dalam tiap-tiap 1 ml atau 1 gram sampel makanan yang diperiksa. Prinsip ALT adalah menghitung pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah sampel makanan ditanam pada lempeng media yang sesuai dengan cara tuang kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35-37° C (Atma, 2016).

Uji angka lempeng total dapat dilakukan dengan dua teknik, yaitu teknik cawan tuang (*pour plate*) dan teknik sebaran (*spread plate*). Pada prinsipnya dilakukan pengenceran terhadap sediaan yang diperiksa kemudian dilakukan penanaman pada media lempeng agar. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada lempeng agar dihitung setelah inkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai. Perhitungan dilakukan terhadap petri dengan jumlah koloni bakteri antara 30-300. Angka lempeng total dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri hasil perhitungan dikalikan faktor pengenceran (Atma, 2016).

Metode hitungan cawan merupakan cara yang paling sensitive untuk menentukan jumlah jasad renik karena beberapa hal yaitu (Atma, 2016):

1. Hanya sel yang masih hidup yang dapat dihitung.
2. Beberapa jenis jasad renik dapat dihitung satu kali.
3. Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi jasad renik karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari jasad renik yang menetap menampilkan pertumbuhan yang spesifik.

Adanya jumlah angka lempeng total yang ditemukan pada suatu sampel dapat dijadikan acuan bahwa sampel tersebut masih layak untuk dikonsumsi atau tidak. Adapun untuk batas persyaratan perhitungan dari angka lempeng total adalah (Atma, 2016):

1. Mikroba yang dapat dihitung 30-300 koloni.
2. < 30 koloni dianggap cemar.
3. > 300 koloni spreader atau tak terhingga sehingga tak dapat dihitung.
4. Perhitungan jumlah bakteri yaitu:

$$\boxed{\text{Jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \text{faktor pengenceran}}$$

5. Perbandingan jumlah bakteri dari pengenceran berturut-turut antara pengenceran yang akhir dengan pengenceran yang sebelumnya.
6. Jika sama atau < 2 maka hasilnya dirata-rata. Jika lebih dari 2 digunakan pengenceran sebelumnya.