

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Pengertian Obat

Menurut Undang–undang No. 36 Tahun 2009 Tentang Kesehatan, obat adalah bahan atau paduan bahan, termasuk produk biologi yang digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologi dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, penyembuhan, pemulihan, peningkatan kesehatan dan kontrasepsi, untuk manusia. Menurut Ansel (1989), obat adalah zat yang digunakan untuk diagnosis, mengurangi rasa sakit, serta mengobati atau mencegah penyakit pada manusia atau hewan. Pada prinsipnya, obat tidak semata–mata berfungsi untuk mendiagnosis, mencegah maupun menyembuhkan berbagai bentuk penyakit, baik yang terjadi pada manusia maupun hewan, tetapi dapat mengakibatkan seseorang keracunan. Obat hanya akan berfungsi jika aman, efektif, selektif dan terjangkau. Obat merupakan alat perantara untuk menyembuhkan atau membebaskan masing–masing individu dari berbagai jenis penyakit yang mendera keberadaannya jika digunakan secara tepat, baik secara waktu maupun dari dosis obat itu sendiri. Sebaliknya, obat akan menjadi racun bagi tubuh masing–masing individu jika dosis yang digunakan melampaui batas.

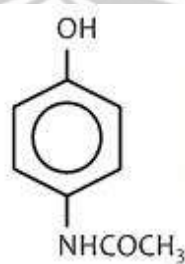
B. Pengertian Sirup

Sirup adalah sediaan pekat dalam air dari gula atau pengganti gula dengan atau tanpa penambahan bahan pewangi, penyedap, dan zat obat. Sirup yang mengandung bahan pemberi rasa tapi tidak mengandung zat–zat obat dinamakan pembawa atau pembawa yang wangi atau harum (sirup). Sirup obat dalam perdagangan dibuat dari bahan–bahan awal yaitu dengan menggabungkan masing–masing komponen tunggal dari sirup seperti sukrosa, air murni, bahan pemberi rasa/perencah, bahan pewarna, bahan terapeutik dan bahan–bahan lain yang perlu dan diinginkan. Sirup merupakan

alat yang menyenangkan untuk pemberian suatu bentuk cairan dari suatu obat yang rasanya tidak enak (Ansel, 1989).

C. Parasetamol

Parasetamol merupakan obat penurun panas dan pereda nyeri yang telah lama dikenal oleh masyarakat Indonesia (Tjay & Rahardja, 2010).



Gambar 1. Struktur kimia parasetamol (Depkes RI, 1979).

Parasetamol merupakan serbuk hablur putih, tidak berbau, rasa pahit. Parasetamol larut dalam 70 bagian air, dalam 7 bagian etanol (95%) *p*, dalam 13 bagian aseton *p*, dalam 40 bagian gliserol *p*, dan dalam 9 bagian propilenglikol *p*, larut dalam larutan alkali hidroksida (Depkes RI, 1979).

D. Puskesmas dan Penyimpanan Obat

Puskesmas adalah fasilitas pelayanan kesehatan yang menyelenggarakan upaya kesehatan masyarakat dan upaya kesehatan perseorangan tingkat pertama, dengan lebih mengutamakan upaya promotif dan preventif, untuk mencapai derajat kesehatan masyarakat yang setinggi-tingginya di wilayah kerjanya (Permenkes, 2014).

Penyimpanan adalah suatu kegiatan pengamanan terhadap obat-obatan yang diterima agar aman (tidak hilang), terhindar dari kerusakan fisik maupun kimia dan mutunya tetap terjamin (Depkes, 2007).

1. Tujuan penyimpanan obat-obatan adalah untuk:
 - a. Memelihara mutu obat
 - b. Menghindari penggunaan yang tidak bertanggung jawab
 - c. Menjaga kelangsungan persediaan
 - d. Memudahkan pencarian dan pengawasan

2. Persyaratan gudang dan pengaturan penyimpanan obat

a. Persyaratan gudang

- 1) Cukup luas minimal $3 \times 4 \text{ m}^2$
- 2) Ruangan kering tidak lembab
- 3) Ada ventilasi agar ada aliran udara dan tidak lembab/panas
- 4) Perlu cahaya yang cukup, namun jendela harus mempunyai pelindung untuk menghindarkan adanya cahaya langsung dan berteralis
- 5) Lantai dibuat dari tegel/semèn yang tidak memungkinkan bertumpuknya debu dan kotoran lain. Bila perlu diberi alas papan (palet)
- 6) Dinding dibuat licin dan dicat warna cerah
- 7) Hindari pembuatan sudut lantai dan dinding yang tajam agar mudah dibersihkan
- 8) Gudang digunakan khusus untuk penyimpanan obat
- 9) Mempunyai pintu yang dilengkapi kunci ganda
- 10) Tersedia lemari/laci khusus untuk narkotika dan psikotropika yang selalu terkunci
- 11) Harus ada pengukur suhu ruangan

b. Pengaturan penyimpanan obat

- 1) Obat disusun secara alfabetis
- 2) Obat dirotasi dengan sistem *First in First out* (FIFO) dan *First expired First out* (FEFO)
- 3) Obat disimpan pada rak
- 4) Obat yang disimpan pada lantai harus diletakan di atas palet
- 5) Tumpukan dus sebaiknya harus sesuai dengan petunjuk
- 6) Sediaan obat cairan dipisahkan dari padatan
- 7) Sera, vaksin, dan supositoria disimpan dalam lemari pendingin
- 8) Lisol dan desinfektan diletakan terpisah dari obat lainnya.

3. Kondisi penyimpanan

Untuk menjaga mutu obat perlu diperhatikan faktor-faktor sebagai berikut:

a. Kelembaban

Udara lembab dapat mempengaruhi obat-obatan yang tidak tertutup sehingga mempercepat kerusakan. Untuk menghindari udara lembab tersebut maka perlu dilakukan upaya-upaya berikut:

- 1) Ventilasi harus baik, jendela dibuka
- 2) Menyimpan obat ditempat yang kering
- 3) Wadah harus selalu tertutup rapat, jangan dibiarkan terbuka
- 4) Bila memungkinkan pasang kipas angin atau AC. Karena makin panas udara di dalam ruangan maka udara semakin lembab
- 5) Biarkan pengering tetap dalam wadah tablet dan kapsul
- 6) Kalau ada atap yang bocor harus segera diperbaiki

b. Sinar matahari

Sinar matahari akan mempengaruhi stabilitas terutama pada sediaan cairan, larutan, dan injeksi. Misalnya pada injeksi klorpromazin yang terkena sinar matahari, akan berubah warna menjadi kuning terang sebelum tanggal kadaluwarsa. Cara mencegah kerusakan karena sinar matahari antara lain:

- 1) Menggunakan wadah botol atau vial yang berwarna gelap (coklat)
- 2) Tidak meletakkan botol atau vial di udara terbuka
- 3) Menyimpan obat-obatan penting di dalam lemari
- 4) Memasang gordena pada jendela
- 5) Mengecat kaca jendela dengan warna putih.

c. Temperatur/panas

Temperatur/panas mempengaruhi stabilitas obat-obatan seperti sediaan salep, krim dan supositoria sangat sensitif terhadap pengaruh panas, dapat meleleh. Sebagai contoh: salep oksitetrasiklin akan melumer bila suhu penyimpanan tinggi dan akan

mempengaruhi kualitas salep tersebut. Ruangan obat sebaiknya sejuk, adapun beberapa jenis obat yang penyimpanannya secara khusus di dalam lemari pendingin pada suhu 4–8 derajat celcius, seperti:

- 1) Vaksin
- 2) Sera dan produk darah
- 3) Antitoksin
- 4) Insulin
- 5) Injeksi antibiotika yang sudah dipakai (sisa)
- 6) Injeksi oksitosin

E. Stabilitas

Stabilitas (Depkes RI, 1995) adalah kemampuan suatu produk untuk bertahan dalam batas yang ditetapkan dan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan, sifat dan karakteristiknya sama dengan yang dimilikinya pada saat dibuat. Efek terapeutik suatu obat tergantung dari banyak faktor antara lain cara dan bentuk pemberian, efek fisikokimiawi yang menentukan reabsorpsi, biotransformasi, dan ekresinya dalam tubuh. Selain itu, faktor individu serta kondisi fisiologi pengguna juga sangat berpengaruh. Hal yang penting adalah stabilitas dari obat itu sendiri. Suatu obat akan memberikan efek terapeutik yang baik jika obat tersebut dalam keadaan baik. Stabilitas obat yang baik mempengaruhi mutu obat. Semua obat yang boleh beredar harus terjamin baik dan diharapkan obat akan sampai ke pasien dalam keadaan baik. Uji stabilitas dilakukan untuk menjamin kualitas produk yang telah diluluskan dan beredar di pasaran. Uji stabilitas yang dilakukan bermanfaat untuk mengetahui pengaruh faktor lingkungan seperti suhu dan kelembaban terhadap parameter–parameter stabilitas produk seperti kadar zat aktif (Luawo *et al*, 2012).

Penyimpanan obat yang kurang baik merupakan suatu masalah dalam upaya peningkatan mutu obat. Syarat mutlak bahwa setiap obat yang beredar

harus aman (*safety*), bermutu (*quality*) dan bermanfaat (*efficacy*) (Luawo *et al*, 2012).

Ada enam kriteria untuk tingkat penerimaan stabilitas, yaitu:

1. Jenis stabilitas

Kondisi yang dipertahankan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan obat.

2. Kimia

Tiap zat aktif mempertahankan keutuhan kimiawi dan potensi yang tertera pada etiket dalam batas yang diinginkan .

3. Fisika

Mempertahankan sifat fisika awal, termasuk penampilan, kesesuaian keseragaman, disolusi, dan kemampuan untuk disuspensikan.

4. Mikrobiologi

Sterilisasi atau resistensi terhadap pertumbuhan mikroba dipertahankan sesuai dengan persyaratan yang dinyatakan. Zat antimikroba yang ada mempertahankan efektifitas dalam batas yang ditetapkan.

5. Terapi

Efek terapi tidak berubah.

6. Toksikologi

Tidak terjadi peningkatan bermakna dalam toksisitas (Depkes RI, 1995).

F. Mikrobiologi

Mikrobiologi dalam bidang kesehatan difokuskan pada penemuan substansi–substansi yang dapat menghancurkan mikroorganisme patogen tanpa menyebabkan hewan atau manusia terinfeksi. Sebagian kecil mikroorganisme bersifat patogen. Mikroorganisme alami dalam tubuh kita disebut mikroorganisme normal atau flora normal. Meskipun flora normal ini tidak bersifat patogen, namun dalam keadaan tertentu dapat bersifat patogen dan dapat menimbulkan penyakit infeksi. Contoh mikroorganisme patogen adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherihia coli O157:H7* yang

menyebabkan diare, *Shigella dysentriae* yang menyebabkan disentri, *khamir Candida albicans* yang menyebabkan keputihan, kapang *Aspergillus flavus* yang menghasilkan alfatoksin yang dapat meracuni makanan, virus *Ebola* yang menyebabkan penyakit Ebola, *human Immunodeficiency virus* yang menyebabkan penyakit AIDS, *protozoa Toxoplasma gondii* yang menyebabkan toksoplasmosis, dan sebagainya.

Mikroorganisme atau mikroba adalah organisme hidup yang berukuran sangat kecil dan hanya dapat diamati menggunakan mikroskop. Mikroorganisme ada yang tersusun atas satu sel (*uniseluler*) dan ada yang tersusun atas beberapa sel (*multiseluler*). Walaupun mikroorganisme *uniseluler* hanya tersusun atas satu sel, namun mikroorganisme tersebut menunjukkan semua karakteristik organisme hidup, yaitu bermetabolisme, bereproduksi, berdiferensiasi, melakukan komunikasi, melakukan pergerakan, dan berevolusi.

Pertumbuhan mikroorganisme lebih ditunjukkan oleh adanya peningkatan jumlah mikroorganisme dan bukan peningkatan ukuran sel individu. Pada dasarnya ada dua macam tipe pertumbuhan, yaitu pembelahan inti tanpa diikuti pembelahan sel sehingga dihasilkan peningkatan ukuran sel (misalnya pada mikroorganisme koenositik) dan pembelahan inti yang diikuti pembelahan sel sehingga dihasilkan peningkatan jumlah sel serta pembesaran ukuran sel diikuti pembelahan membentuk dua progeni yang kurang lebih berukuran sama.

Ciri khas reproduksi bakteri adalah pembelahan biner (*binary fussion*), dimana dari satu sel bakteri dapat dihasilkan dua sel anakan yang sama besar. Bila sel tunggal bakteri bereproduksi dengan pembelahan biner, maka populasi bakteri bertambah secara geometrik.

Mikroorganisme memiliki empat fase dalam pertumbuhannya, yaitu fase *lag*, fase *log* (fase eksponensial), fase *stasioner*, dan fase kematian.

1. Fase *lag*

Fase *lag* merupakan fase adaptasi, yaitu fase penyesuaian mikroorganisme pada suatu lingkungan baru. Ciri pada fase ini adalah

tidak adanya peningkatan jumlah sel, melainkan yang terjadi pada fase ini hanyalah peningkatan ukuran sel. Lama fase *lag* tergantung pada kondisi dan jumlah awal mikroorganisme dan media pertumbuhan. Bila sel-sel mikroorganisme diambil dari kultur yang sama sekali berlainan, maka yang sering terjadi mikroorganisme tersebut tidak mampu tumbuh dalam kultur.

2. Fase *log* (fase eksponensial)

Fase log (fase eksponensial) merupakan fase dimana mikroorganisme tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum, tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media dan kondisi pertumbuhan. Sel baru terbentuk dengan laju konstan dan masa yang bertambah secara eksponensial. Hal yang dapat menghambat laju pertumbuhan adalah bila satu atau lebih nutrisi dalam kultur habis, sehingga hasil metabolisme yang bersifat racun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan. Organisme aerob, nutrisi yang membatasi pertumbuhan biasanya adalah oksigen. Bila konsentrasi sel mikroorganisme melebihi 1×10^9 /mL, maka laju pertumbuhan akan berkurang, kecuali bila oksigen dimasukkan secara paksa kedalam kultur dengan pengadukan atau penggojokan (*shaking*). Bila konsentrasi sel mencapai $4-5 \times 10^9$ /mL, laju penyebaran oksigen tidak dapat memenuhi kebutuhan meskipun dalam kultur tersebut diberikan udara yang cukup, dan pertumbuhan akan diperlambat secara progresif.

3. Fase *stasioner*

Pada fase ini pertumbuhan mikroorganisme berhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang membelah dan jumlah sel yang mati. Pada fase ini terjadi akumulasi produk buangan yang toksik. Pada sebagian besar kasus, pergantian sel terjadi dalam fase stasioner ini. Terdapat kehilangan sel yang lambat karena kematian diimbangi oleh pertumbuhan sel-sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan dengan nutrisi yang dilepaskan oleh sel-sel yang mati karena mengalami lisis.

4. Fase kematian

Pada fase kematian, jumlah sel yang mati meningkat. Faktor penyebabnya adalah tidak tersedianya nutrisi dan akumulasi produk buangan yang toksik.

G. Pemeriksaan Mikrobiologi

Keamanan produk terutama pada sediaan obat merupakan suatu tuntutan yang telah dikemukakan sejak munculnya gangguan kesehatan manusia akibat adanya cemaran mikroorganisme. Produk yang tercemar mikroorganisme tersebut dapat memproduksi racun yang dapat menyebabkan timbulnya suatu penyakit. Oleh karena itu, obat-obatan perlu kontrol kualitasnya secara rutin yang melibatkan analisis kimia dan mikrobiologi untuk memastikan bahwa obat-obatan tersebut terjaga kualitas dan khasiatnya. Adeshina *et al* (2009) dalam suatu penelitiannya di Nigeria mengungkapkan bahwa empat belas dari dua puluh sampel sirup dan suspensi yang diuji sangat terkontaminasi, di antaranya terdapat mikroba seperti *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian ini telah menunjukkan bahwa beberapa sediaan sirup dan suspensi untuk anak yang dijual di gerai ritel di Ilorin, Nigeria terkontaminasi dengan agen mikroba. Pada penelitian yang lain mengungkapkan bahwa analisis mikrobiologi dari tiga jenis sediaan cairan oral memberi hasil yang memuaskan. Hanya satu merek sirup asam askorbat yang gagal secara analisis mikrobiologi (Kamaldeen *et al*, 2014).

Produk obat berbentuk padat, yaitu tablet, kapsul, serbuk atau puyer mempunyai daya tahan lebih lama dibandingkan obat berbentuk cairan misalnya sirup, emulsi dan suspensi. Pada sediaan tersebut memiliki risiko yang lebih besar dari kontaminasi mikroba selama konsumsi karena dengan membuka tutup botol yang berturut-turut akan memudahkan mikroorganisme untuk mencemari sediaan tersebut, terlebih dalam sediaan larutan terdapat pemanis dan kelembaban yang mendukung untuk tumbuhnya mikroba. Pada suatu penelitian di Sri Lanka, mengungkapkan bahwa kontaminasi mikroba

sangat tinggi dalam sediaan larutan selama masa konsumsi ditemukan *E.coli* dan *spesies streptococcus* ditemukan di parasetamol, amoxicillin, sefaleksin (Sudeshika *et al.*, 2014).

Produk obat dikatakan rusak secara mikrobiologis apabila dijumpai mikroorganisme patogen dalam konsentrasi rendah, dan mikroorganisme yang berpotensi menjadi patogen dalam konsentrasi rendah. Mikroorganisme yang mengkontaminasi suatu produk obat akan menghasilkan metabolit yang bersifat toksik yang tidak hilang dengan kematian mikroorganisme kontaminannya. Pertumbuhan mikroorganisme juga akan menimbulkan kerusakan fisik ataupun kimia pada produk obat akibat adanya pertumbuhan mikroorganisme yang ditandai oleh adanya perubahan bentuk, warna, rasa, dan bau.

Obat yang rusak daya terapinya tidak hanya turun, tetapi bahkan dapat menyebabkan efek yang membahayakan kesehatan. Kandungan senyawa aktifnya dapat teroksidasi atau terurai membentuk senyawa lain yang mungkin bersifat toksik atau lebih beracun dibandingkan zat aslinya. Kerusakan ini dapat berupa adanya biodegradasi ataupun biosintesis, misalnya biodegradasi protein, biodegradasi karbohidrat, serta biodegradasi lemak dan minyak.

Pemeriksaan mikrobiologi sediaan farmasi dilakukan dengan menumbuhkan sampel pada suatu media lalu diinkubasi dan dilihat pertumbuhan mikroorganismenya. Terdapat berbagai metode dalam mengukur pertumbuhan sel bakteri. Perhitungan sel bakteri terdiri atas dua cara, yaitu perhitungan langsung dan tidak langsung.

1. Perhitungan Langsung

a. Metode Turbidimetri

Secara rutin jumlah sel bakteri dapat dihitung dengan cara mengetahui kekeruhan (turbiditas) kultur. Semakin keruh suatu kultur, semakin banyak jumlah selnya. Prinsip dasar metode

turbidimetri adalah, jika cahaya mengenai sel, maka sebagian cahaya yang diserap dan sebagian cahaya diteruskan. Jumlah cahaya yang diserap proporsional (berbanding lurus) dengan jumlah sel bakteri atau jumlah cahaya yang diteruskan berbanding terbalik dengan jumlah sel bakteri. Semakin banyak jumlah sel, semakin sedikit cahaya yang diteruskan.

b. Metode *Total Count*

Total count memerlukan mikroskop dan wadah yang diketahui volumenya. Jika setetes kultur dimasukkan ke dalam wadah (misalnya hemositometer) yang telah diketahui volumenya, maka jumlah sel dapat dihitung. Akan tetapi, cara tersebut memiliki keterbatasan, yaitu tidak dapat membedakan sel hidup dan sel mati dan tidak dapat digunakan pada jumlah sel yang sangat sedikit (kurang dari 10^6 sel/ml).

Metode yang lebih memuaskan dalam mengukur jumlah sel adalah *Electronic Total Count*. Jika medan listrik mengenai sel hidup, maka timbul kejutan listrik. Akan tetapi, jika medan listrik mengenai sel mati, maka tidak timbul kejutan listrik. Semakin banyak kejutan listrik, semakin banyak pula jumlah sel yang hidup.

c. Metode Berat Kering

Cara yang paling cepat mengukur jumlah sel adalah metode berat kering. Metode tersebut relatif lebih mudah dilakukan, yaitu kultur disaring atau disentrifugasi, kemudian bagian yang tersaring atau yang mengendap hasil sentrifugasi dikeringkan. Pada metode itu juga tidak dapat membedakan sel hidup dan sel mati. Akan tetapi, keterbatasan itu tidak mengurangi manfaat metode tersebut dalam hal mengukur efisiensi fermentasi, karena pertumbuhan diukur dengan satuan berat, sehingga dapat diperhitungkan dengan parameter konsumsi substrat dan produksi senyawa yang diinginkan (Pratiwi, 2008).

2. Perhitungan Tidak Langsung

Metode angka lempeng total sering disebut dengan metode *total plate count* (TPC). Kultur diencerkan sampai batas yang diinginkan. Kultur encer ditumbuhkan kembali pada media, sehingga diharapkan setiap sel tumbuh menjadi 1 koloni beberapa saat berikutnya, biasanya 4–12 jam.

Akan tetapi, cara ini memiliki keterbatasan, yaitu jumlah sel terhitung biasanya lebih kecil dari sebenarnya (kemungkinan besar 1 koloni dapat berasal lebih dari 2 sel) dan tidak dapat diaplikasikan pada bakteri yang tumbuh lambat.

Pada metode tersebut yang perlu diperhatikan adalah jumlah sel bakteri harus mendekati kelipatan 10 pada setiap pengencerannya. Jika tidak maka perhitungan dianggap gagal. Misalnya cawan yang dapat dihitung jumlahnya adalah yang mempunyai jumlah sel sekitar 2–4 untuk sampel pengenceran (10^{-x}), 20–40 untuk sampel pengenceran ($10^{-(x+1)}$), dan 200–400 untuk sampel pengenceran ($10^{-(x+2)}$) (Pratiwi, 2008).

Untuk melaporkan hasil analisis mikrobiologi dengan cara hitungan cawan digunakan suatu standar yang disebut *Standar Plate Count* (SPC) sebagai berikut:

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30-300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung satu koloni.
3. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung satu koloni.

Dalam SPC ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yaitu angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal). Jika angka ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Sebagai contoh $1,7 \times 10^3$ unit koloni/ml atau $2,0 \times 10^6$ unit koloni/g.
2. Jika pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi. Maka dari itu dicatat angka sebenarnya dari pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Lempeng Total perkiraan.
3. Jika pada semua pengenceran menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah. Oleh karena itu, jumlah koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran.
4. Jika pada cawan dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menghasilkan jumlah koloni antara 30-300 dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua maka dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan faktor pengenceran. Jika perbandingan hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari dua, yang dilaporkan hanya dari hasil pengenceran terkecil.
5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu. Oleh karena itu, harus dipilih tingkat pengenceran yang menghasilkan kedua cawan duplo dengan koloni di antara 30–300 (Fardiaz, 1992).