BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Air Zamzam

Air Zamzam adalah air suci yang berasal dari sumur di dalam kompleks Masjidil Haram, Mekkah, Arab Saudi. Sumur ini memiliki kedalaman sekitar 30 meter dan berjarak 21 meter dari Ka'bah (Khalid et al., 2014). Secara historis, sumur Zamzam telah ada sejak zaman Nabi Ibrahim AS dan memiliki nilai spiritual yang tinggi bagi umat Islam. Nama air Zamzam berasal dari istri Ibrahim A.S., Siti Hajar A.S. ketika beliau mencoba menghentikan aliran air Zamzam dan dalam prosesnya mengucapkan kata Zom-zom yang berarti berhenti mengalir. Air Zamzam adalah air yang berasal dari sumur Zamzam di dalam Masjidil Haram, Makkah, Arab Saudi. Sumur Zamzam sendiri terletak 20 meter di sebelah timur Ka'bah dengan kedalaman 42 meter. Air dari sumur diteorikan berasal dari gunung di sekitarnya di mana hujan kadang-kadang terjadi. Air kemudian disaring oleh lapisan mineral di dalam tanah sebelum mencapai sumur Zamzam itu sendiri, memberikan air komposisi mineral yang unik.

Tabel 2. 1 Kandungan Air Zamzam (Gerung, M. D. M.,2021)

Mineral	Konsentrasi(mg/ml)
Sodium	133
Kalsium	96
Magnesium	38.88
Potasium	43.33
Bikarbonat	195.4
Klorida	163.3
Fluor	0.72
Nitrat	124.8
Sulfat	124

Air zamzam memiliki khasiat sebagai obat jika dihubungkan dengan medis. Banyak khasiat dari air zamzam yang dapat digunakan dalam mengobati segala macam penyakit. Kandungan fluoride yang tinggi dalam air zamzam dapat menjaga kesehatan mulut dan gigi. hakikatnya air zamzam mengandung mineral pertama yang diperlukan tubuh dan sumur air zamzam adalah sumur yang tidak pernah ditumbuhi lumut dan mikroorganisme. Karena keistimewaan air zamzam, maka air zamzam

menjadi salah satu oleh-oleh favorit bagi orang yang sedang melakukan haji atau umroh. Menurut Ibnu Abbas r.a, Rasulullah saw bersabda, "Sebaik-baik air di muka bumi adalah air Zamzam, di dalamnya terdapat makanan yang mengenyangkan dan penawar bagi penyakit" (HR. Thabrani).Kemampuan penyembuhan air zamzam bukan hanya karena mukjizat atau sugesti belaka tetapi dapat dibuktikan secara ilmiah.

Peneliti menyebutkan bahwa air zamzam mengandung beberapa unsur kimia yang memiliki ion positif dan negatif. Shomar dalam tulisannya menyebutkan bahwa di tahun 2011 dilaporkan bahwa air zamzam terdeteksi beracun karena memiliki kadar arsenic yang tinggi. Dari 30 sampel air zamzam yang diuji dengan lokasi pengambilan air zamzam yang berbeda. Hasilnya menunjukkan bahwa air zamzam memiliki konsentrasi rata-rata arsenic dan nitrit tiga kali lebih tinggi dari standar WHO yang bersifat karsinogen bagi manusia. Hany et al. pada tahun 2020 melakukan penelitian terkait adanya kontaminasi bakteri dan tingginya zat karsinogen yang terkandung di dalam air zamzam. Percobaan dilakukan selama 3 bulan berturut turut dengan menggunakan hewan coba tikus putih. Hasil penelitian tersebut menegaskan bahwa air zamzam bebas dari bakteri patogen dan cukup aman untuk kesehatan ginjal dan hati, yang menunjukkan bahwa konsumsi air zamzam dalam waktu yang cukup lama tidak ditemukan adanya tanda toksisitas dari kandungan arsenic dan Gambaran histologi struktur ginjal yang normal .

Penelitian yang sejalan dilakukan oleh Ahmed et al di tahun 2021 dengan membandingkan komposisi air zamzam keran dan air zamzam sesuai dengan pedoman kualitas air secara internasional. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari enam sampel air zamzam dari keran serta satu sampel botol air zamzam yang dianalisis dengan hasil seluruh parameter yang diuji berada di bawah batas maksimum yang diizinkan oleh WHO.



Gambar 2. 1 Air Zamzam Kemasan
Sumber: *https://images.app.goo.gl/41LRzGKiM1UuHDc86*

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengungkap sifat unik air zamzam, dan hasilnya menunjukkan bahwa kandungan mineral dalam air ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan air sumur dan air mineral kemasan. Air Zamzam termasuk air alami yang dapat diminum langsung sebagai air minum dan memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan jenis air lainnya yang dapat berperan penting bagi tubuh manusia. Dapat diminumnya secara langsung menunjukkan bahwa air Zamzam sangat higienis, terbebas dari polutan, dan memiliki kandungan spesi-spesi kimia dalam kadar masih di bawah nilai batas aman untuk diminum. Pada air Zamzam sistem pengolahan filter pasir, filter mikro, dan desinfikasi ultraviolet mulai diterapkan pada tahun 1994 setelah dibentuk Zamzam Studies Research Center (ZSRC), yaitu badan khusus yang bertugas menjaga kualitas dan kuantitas air Zamzam.

2.2 Peredaran Air Zamzam di Indonesia

Perusahan yang dibentuk Kerajaan Arab Saudi yakni National Water Company diberikan mandat secara khusus untuk menjadi satu-satunya pihak yang mengelola dan mengemas air zam-zam untuk mencegah pemalsuan dan praktik perjokian dalam distribusi air tersebut. Pusat pengemasan serta pendistribusian air zamzam itu berjarak empat km dari Masjidil Haram dan dalam setiap harinya mereka menyedot air dari sumur zam-zam di sekitar Hijir Ismail sebanyak 200 ribu liter untuk disaring. Air Zamzam yang beredar di Indonesia umumnya dibawa oleh jamaah haji/umrah untuk konsumsi pribadi dengan batasan volume tertentu (Al-Badr et al., 2019). Pemerintah Arab Saudi sejak tahun 2010 telah melarang ekspor air Zamzam untuk tujuan komersial. Kebijakan ini menyebabkan

peningkatan penjualan air Zamzam palsu secara global, yang menimbulkan kekhawatiran di kalangan konsumen, terutama umat Muslim (Rasyida, et al., 2014). Indonesia merupakan negara yang masih dalam tahap tumbuh dan berkembang khususnya dalam bidang industri barang dan jasa dengan skala besar maupun kecil baik dari segi makanan, minuman atau lainnya. Bidang usaha saat ini yang berkembang dan diminati salah satunya adalah bidang usaha penjualan air zamzam. Oleh karena itu, masih ditemukan peredaran air zamzam dalam bentuk kemasan yang dijual secara bebas di berbagai tempat, termasuk di kawasan kampung Arab di berbagai kota Indonesia.

2.3 Embong Arab Kota Malang

Embong Arab atau Kampung Arab merupakan kawasan bersejarah di Kota Malang yang terletak di sekitar Masjid Agung Jami Malang. Kawasan ini telah ada sejak zaman kolonial Belanda dan dihuni oleh komunitas keturunan Arab (Basundoro, 2016). Sebagai pusat komunitas Arab, kawasan ini terkenal dengan berbagai produk khas Timur Tengah, termasuk penjualan air Zamzam kemasan. Embong Arab bukan hanya sekedar kawasan pemukiman, melainkan juga merupakan simbol identitas dan warisan budaya yang kaya. Permukiman ini mulai berkembang pada akhir abad ke-19, ketika gelombang imigran dari Arab, khususnya dari Hadramaut di Yaman, mulai tiba di Indonesia (Nashoih, 2018). Mereka datang dengan berbagai alasan, termasuk mencari peluang ekonomi yang lebih baik dan menyebarkan ajaran Islam. Di Malang, mereka menemukan tanah yang subur, tidak hanya untuk berdagang tetapi juga untuk membangun komunitas yang solid dan melestarikan tradisi serta budaya mereka.

Keberadaan Embong Arab telah memberikan kontribusi yang signifikan terhadap perkembangan kebudayaan Arab di Malang. Hal ini terlihat dari berbagai aspek, seperti arsitektur, kuliner, bahasa, dan ritual keagamaan (Huda, A. A. A., 2017). Bangunan-bangunan di Embong Arab seringkali menunjukkan gaya arsitektur khas Timur Tengah, dengan sentuhan lokal yang mencerminkan proses akulturasi budaya. Selain itu,

kurma, air zamzam kemasan, masakan khas Arab, seperti kebuli, roti Maryam, dan makanan berbumbu rempah lainnya, telah menjadi bagian penting dari kekayaan kuliner Malang, yang sangat disukai oleh penduduk lokal maupun wisatawan. Sebagian besar toko disana menjual air zamzam kemasan.

2.4 Mikroba

Mikroorganisme, umumnya disebut sebagai mikroba, didefinisikan sebagai entitas dimensi mikroskopis yang memerlukan pemanfaatan instrumen tambahan untuk pengamatannya. Mikroorganisme mencakup berbagai kategori, termasuk prokariota, protista, dan ganggang renik; terutama, mikroorganisme Protista bersel tunggal tertentu memang dapat dibedakan dengan mata manusia tanpa bantuan (Harahap et al., 2021). Mikroorganisme tersebar di mana-mana di berbagai lingkungan, termasuk tanah, debu, udara, dan sistem akuatik, dan mereka menghuni sistem fisiologis hewan, tumbuhan, dan manusia. Sifat kecil dan ringan sel mikroba memfasilitasi pengusiran mereka melalui aliran udara. Sementara mikroorganisme tertentu memberikan efek menguntungkan pada manusia, sejumlah besar memiliki potensi patogen, yang mengarah ke segudang penyakit, terutama yang terkait dengan kontaminasi bawaan makanan yang dikaitkan dengan mikroorganisme. (Padoli, 2016).

Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh banyak faktor, yang terdiri dari suhu, tingkat pH, kebutuhan oksigen, dan ketersediaan nutrisi. Berdasarkan suhu pertumbuhan optimalnya, mikroorganisme dapat dikategorikan ke dalam beberapa klasifikasi: psikrofil, psikotrof, mesofil, termofil, dan hipertermofil. Bakteri psikrofilik berkembang dalam kisaran suhu 0 hingga 20 ℃, psikotrof dapat bertahan dalam kisaran suhu 0 hingga 35 ℃, mesofil menghuni kisaran suhu 20 hingga 45 ℃, termofil bertahan dalam kisaran 45 hingga 65 ℃, sementara hipertermofil dapat menahan suhu mencapai hingga 100 ℃ (Andriwibowo, 2021).

Kebutuhan oksigen bukanlah persyaratan mutlak untuk mikroorganisme dalam proses perkembangannya; melainkan, mereka dapat dikategorikan ke dalam empat kelompok yang berbeda berdasarkan kebutuhan oksigen mereka. Kelompok pertama terdiri dari mikroorganisme

aerobik, yang membutuhkan oksigen sebagai akseptor elektron selama proses pernapasan. Sebaliknya, anaerob tidak memerlukan oksigen, karena keberadaannya mengarah pada pembentukan hidrogen peroksida (H2O2), zat yang merugikan dan berpotensi mematikan bagi mikroorganisme ini. Selain itu, ada mikroorganisme fakultatif anaerobik yang berkembang dalam kondisi yang tidak sepenuhnya aerobik, serta mikroorganisme mikroaerofilik yang memerlukan konsentrasi oksigen terbatas untuk mencegah penghambatan aktivitas enzimatik oksidatif (Hamdiyati, 2011).

2.5 Parameter Mikrobiologi Air Mineral alami

Air mineral alami didefinisikan sebagai air minum yang diperoleh langsung dari sumber alami atau melalui pengeboran sumur, dengan proses yang terkendali untuk mencegah kontaminasi atau pengaruh eksternal terhadap sifat kimia, fisika, dan mikrobiologinya. Air ini dikonsumsi dalam bentuk aslinya tanpa melalui proses tambahan yang dapat mengubah komposisi alaminya. Air zamzam termasuk air mineral alami karena berasal dari sumber air yang terjaga keasliannya dan memiliki kandungan mineral yang lebih tinggi dibandingkan dengan air biasa. Air ini memiliki karakteristik unik, seperti pH yang bersifat alkali dan kandungan mineral seperti kalsium, magnesium, dan sodium yang lebih tinggi.Berdasarkan SNI 6242-2023 tentang Persyaratan mutu Air Mineral alami, parameter mikrobiologi yang harus dipenuhi adalah:

Tabel 2. 2 Parameter Mikrobiologi

No	Jenis cemaran mikroba	n	c	m	M
1	Angka lempeng total (ALT)	5	0	10^2 koloni/ml	NA
2	Kaliform	5	0	Tidak terdeteksi 250ml	NA
3	*Escherichia coli*	5	0	Tidak terdeteksi 250ml	NA
4	Bakteri anaerob produksi sulfit pembentuk spora	5	0	Tidak terdeteksi 250ml	NA
5	*Enterococci*	5	0	Tidak terdeteksi 250ml	NA
6	*Pseudomonas aeruginosa*	5	0	Tidak terdeteksi 250ml	NA

2.6 ALT

2.6.1 Metode Analisis ALT

Total cemaran mikroba atau angka lempeng total menunjukkan jumlah mikroba dalam suatu produk. Di beberapa negara dinyatakan sebagai *Aerobic Plate Count* (APC) atau *Standart Plate Count* (SPC) atau *Aerobic Microbial Count* (AMC). Angka Lempeng Total (ALT) disebut juga *Total Plate Count* (TPC) adalah jumlah mikroba aerob mesofilik per gram atau per milimeter contoh yang ditentukan melalui metode standar (BPOM, 2012).

Total cemaran mikroba secara umum tidak terkait dengan bahaya keamanan pangan namun kadang bermanfaat untuk menunjukkan kualitas, masa simpan/waktu paruh, kontaminasi dan status higienis pada saat proses produksi. Media Plating (sumber energi) yang digunakan dalam pengujian ALT dapat mempengaruhi jumlah dan jenis bakteri yang diisolasi karena perbedaan dalam persyaratan nutrisi dan garam pada tiap mikroba (SNI, 2009:20). ALT untuk produk pangan dalam kaleng dinyatakan dalam ALT aerob dan ALT anaerob. ALT anaerob dimaksudkan untuk menunjukkan kontaminasi pasca proses pengalengan (BPOM, 2012).

Prinsip dari metode hitungan cawan atau *Total Plate Count* (TPC) adalah menumbuhkan sel mikroorganisme yang masih hidup pada media agar, sehingga mikroorganisme akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Pada metode ini, teknik pengenceran merupakan hal yang harus dikuasai. Sebelum mikroorganisme ditumbuhkan dalam media, terlebih dahulu dilakukan pengenceran sampel menggunakan larutan fisiologis. Tujuan dari pengenceran sampel yaitu mengurangi jumlah kandungan mikroba dalam sampel sehingga nantinya dapat diamati dan diketahui jumlah mikroorganisme secara spesifik sehingga didapatkan perhitungan yang tepat. Pengenceran memudahkan dalam perhitungan koloni (Fardiaz, 1992).

Menurut Elisabeth (2017) setelah dilakukan pengenceran, kemudian dilakukan penanaman pada media lempeng agar. Setelah diinkubasi, jumlah koloni masing-masing cawan diamati dan dihitung. Koloni merupakan sekumpulan mikroorganisme yang memiliki kesamaan sifat seperti bentuk,

susunan, permukaan, dan sebagainya. Sifat-sifat yang perlu diperhatikan pada koloni yang tumbuh di permukaan medium adalah sebagai berikut :

a. Besar kecilnya koloni. Ada koloni yang hanya berupa satu titik, namun ada pula yang melebar sampai menutup permukaan medium.
b. Bentuk, ada koloni yang bulat dan memanjang. Ada yang tepinya rata dan tidak rata.
c. Kenaikan permukaan, ada koloni yang rata dengan permukaan medium, ada pula yang timbul di atas permukaan medium.
d. Halus kasarnya permukaan. Ada koloni yang permukaannya halus, ada yang permukaannya kasar dan tidak rata.
e. Wajah permukaan, ada koloni yang permukaannya mengkilap dan ada yang permukaannya suram.
f. Warna, kebanyakan koloni bakteri berwarna keputihan atau kekuningan.
g. Kepekatan, ada koloni yang lunak seperti lendir, ada yang keras dan kering.

Selanjutnya perhitungan dilakukan terhadap cawan petri dengan jumlah koloni bakteri antara 30-300. Perhitungan *Total Plate Count* dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri hasil perhitungan dikalikan faktor pengencer (Fardiaz, 1987 dalam Elisabeth, 2017).

Keuntungan dari metode TPC adalah dapat mengetahui jumlah mikroba yang dominan. Keuntungan lainnya dapat diketahui dengan adanya mikroba jenis lain yang terdapat dalam contoh (Elisabeth, 2017). Menurut Sulistiastutik (2017) metode ini memiliki kelemahan diantaranya:

a. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel mikroorganisme yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
b. Medium dengan kondisi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda.
c. Mikroorganisme yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.

d. Perlu persiapan dan waktu inkubasi beberapa hari sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.

Uji *Total Plate Count* menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual dan dihitung. Sebelum diuji di media padat, sampel terlebih dahulu harus diencerkan. Pengenceran sampel dilakukan terhadap sediaan yang akan diidentifikasi kemudian ditanam pada media lempeng agar dihitung setelah inkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai. Perhitungan dilakukan terhadap petri dengan jumlah koloni bakteri antara 30-300. *Total Plate Count* dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri hasil perhitungan dikalikan faktor pengencer (Fardiaz, 1992).

2.6.2 Prosedur Pengujian

2.6.2.1 Persiapan dan Inokulasi (BSN,2015)

Gunakan metode cawan tuang. Contoh uji ditempatkan sejumlah (atau hasil pengencerannya) tidak melebihi 2 mL di cawan Petri, tambahkan 15 ml sampai dengan 20 ml. media cair steril dan campur hati-hati dengan memutar pelan-pelan. biarkan media untuk membeku. Waktu antara penambahan bahan yang diuji (atau pengencerannya) dan penambahan media cair tidak boleh melebihi 15 menit. Inokulasi paling tidak satu cawan untuk inkubasi di masing-masing suhu.

2.6.2.2 Teknik Cawan Tuang

2.6.2.2.1 Persiapan Contoh

Sebelum pengujian,dilakukan pencampuran contoh dengan baik dengan pengocokan yang kuat untuk memperoleh distribusi mikroorganisme yang merata. Tergantung pada contoh air dan kandungan mikroorganisme yang diperkirakan, buat pengenceran yang diperlukan. Pada metode hitungan cawan umumnya digunakan pengenceran secara desimal Untuk pengenceran desimal (satu per sepuluh kali), ukur 90 ml atau 9 mL pengencer dan masukkan pada botol atau tabung pengencer steril sebagai altenatif, dapat digunakan pengencer dengan volume tersebut yang telah disterilisasi terlebih dahulu pada botol bertutup ulir.

Satu atau lebih pengenceran desimal dilakukan dengan cara

memindahkan satu volume contoh air ke dalam sembilan volume pengencer. Campur larutan sepenuhnya (dengan pipet baru atau secara mekanis) dan pindahkan satu volume dari pengenceran ini pada sembilan volume pengenceran berikutnya. Tahap Ini diulang sesuai dengan yang diperlukan Siapkan volume yang cukup untuk setiap pengenceran sesuai dengan yang diperlukan untuk semua pengujian terhadap contoh/Untuk pengenceran tidak secara desimal, volume pengencer harus disesuaikan dengan volume contoh, Beberapa pendekatan dapat dilakukan, misalnya seri pengenceran 3 atau 4 kali, atau seri pengenceran desimal dimana dilakukan penyaringan dengan volume 10 mL dan 30 ml. Pengenceran empat kali dapat dilakukan sebagaimana yang dilakukan untuk pengenceran desimal, tetapi dalam hal ini satu volume contoh air dicampur dengan tiga volume pengencer. Jika konsentrasi target mikroorganisme diperkirakan tinggi, tahap pengenceran seratus kali (satu per seratus) dapat digunakan

2.6.2.2.2 Porsi Uji

Penggunaan volume porsi uji (bagian yang diuji) dari contoh atau hasil pengenceran contoh, dapat bervariasi antara 0,1 mL dan 2 mL, tergantung pada ukuran cawan Petri dan volume media pembiakan yang digunakan. Pengenceran harus dipilih sedemikian rupa sehingga jumlah koloni yang terbentuk di cawan dengan diameter 90 mm sampai 100 mm diharapkan antara 10 dan 300. Walaupun demikian, perlu dicatat bahwa jumlah total koloni yang dapat dihitung tergantung pada ukuran koloni dan jumlahnya mungkin harus dikurangi untuk koloni yang berukuran besar.

2.6.2.2.3 Inokulasi

Media yang dibutuhkan dicairkan dalam penangas air atau cara lain yang sesuai (misal dengan inkubator udara yang sesuai, autoklaf dengan uap air mengalir atau oven microwave, apabila kombinasi waktu/suhu pemanasan telah divalidasi untuk pembuatan media). Hindari pemanasan yang berlebihan dan ambil media segera setelah mencair. Tempatkan media cair tersebut di penangas air pada suhu (45

± 1) °C dalam waktu yang cukup sehingga suhu media sama dengan suhu penangas. Lebih diutamakan untuk tidak menyimpan media di penangas air lebih dari 4 jam. Jangan mencairkan media lebih dari satu kali. Siapkan dan tandai cawan Petri yang diperlukan. Buat pengenceran yang diperlukan. Setelah dikocok dengan merata, bagikan porsi uji ke dalam cawan. Pindahkan setiap tabung atau wadah media yang sudah mencair dari penangas air, keringkan bagian luarnya dan lewatkan bagian lehernya pada api. Tambahkan media ke tiap cawan Petri tanpa menunda untuk meminimalkan porsi uji dari syok karena panas, dan campur dengan hati-hati sehingga diperoleh distribusi mikroorganisme yang merata pada cawan. Umumnya 15 mL media digunakan untuk porsi uji sebanyak 1 ml atau 2 ml. Biarkan cawan memadat pada permukaan datar. Segera sesudah agar memadat, inkubasi cawan.

2.6.3 Inkubasi dan pengamatan

Cawan dibalikkan dan diinkubasi satu set pada (36 ± 2) °C selama (44 ± 4) jam; inkubasi set lainnya pada (22 ±2) °C selama (68 ± 4) jam. Amati cawan segera setelah dikeluarkan dari inkubator; apabila tidak memungkinkan simpan pada suhu (5±3) °C dan amati dalam waktu 48 jam. Abaikan setiap cawan yang pertumbuhannya melebar (tidak ada batas sambungan) dan atau berlebihan menutupi cawan.

2.6.4 Perhitungan koloni (ISO 8199)

Setelah inkubasi amati cawan. Jika tidak memungkinkan, dapat disimpan pada suhu (53) °C dalam periode waktu yang pendek (misal beberapa hari) yang dipastikan tidak mempengaruhi terhadap jumlah, penampakan atau konfirmasi koloni. Jika cawan disimpan, lakukan validasi periode penyimpanan sehingga sesuai dengan metode.

Perhitungan hasil pada bagian ini dapat digunakan pada kasus dimana jumlah total koloni pada cawan adalah antara 10 dan 300. Mengingat setiap koloni diasumsikan berasal dari satu mikroorganisme atau dari agregat tunggal mikroorganisme, maka hasil dinyatakan sebagai jumlah koloni dalam satu volume acuan spesifik dari contoh (umumnya 100 ml atau 1 mL) dengan menggunakan persamaan :

$C_s = \frac{Z}{Vtot} \times V_s$

C_s adalah estimasi jumlah koloni dalam volume Vs contoh

Z adalah jumlah koloni yang dihitung pada cawan atau pada membrane yang

Diperoleh dari pengenceran d1,d2…,d, atau diperoleh dari volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran)

V_s adalah volume acuan yang dipilih untuk menyatakan konsentrasi mikroorganisme dalam contoh;

V_{tot} adalah volume contoh awal yang terhitung yang digunakan dalam cawan yang di enumerasi. V_{tot} adalah jumlah volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran) atau dihitung menggunakan persamaan(2):

$V_{tot} = (n_1V_1d_1) + (n_2V_2d_2) + \ldots\ldots + (n_1V_1d_1)$

V_{tot} adalah volume contoh awal yang terhitung yang digunakan dalam cawan yang di enumerasi

$n_1,n_2,..n_i$ adalah jumlah cawan yang dihitung untuk pengenceran $d_1,d_{2,\ldots..}d_i$

$V_1,V_2,..V_i$ adalah volume uji yang digunakan dengan pengenceran $d_1,d_{2,\ldots..}d_i$

$d_1,d_2,..d_i$ adalah pengenceran yang digunakan untuk volume uji $V_1,V_2,..V_i$(d =1 untuk contoh yang tidak diencerkan, d =0,1 untuk pengenceran sepersepuluh dan seterusnya.