

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Pengganti Air Susu Ibu (PASI)

Walaupun ASI adalah makanan paling ideal bagi bayi, namun tidak semua ibu dapat memberikan ASI pada bayinya. Menurut Dinkes Propinsi Sumatera Utara (2005) penggunaan susu formula sebagai PASI dapat dimengerti jika alasannya:

- Bayi sakit seperti kekurangan cairan, radang mulut atau infeksi paru-paru
- Bayi lahir dengan berat badan rendah
- Bayi lahir sumbing (bawaan)

Pemberian PASI juga dapat disebabkan oleh masalah pada pihak ibu:

- Jumlah dan mutu ASI tidak mencukupi, sakit dan karena sakitnya dilarang menyusui oleh dokter, baik untuk kepentingan ibu maupun bayinya, seperti ginjal atau penyakit menular
- Ibu menderita infeksi, luka puting (mastitis)
- Ibu mengalami gangguan jiwa atau epilepsi
- Ibu sedang menjalani terapi obat yang tidak aman bagi bayi

Untuk alasan-alasan tersebut, pada umumnya bayi harus diberi makanan pengganti ASI (PASI) berupa susu formula. Pada umumnya susu formula untuk bayi terbuat dari susu sapi

yang susunan zat gizinya diubah sedemikian rupa sehingga dapat diberikan kepada bayi tanpa menimbulkan efek samping. Oleh karena ASI yang paling ideal untuk bayi maka perubahan yang dilakukan pada komponen gizi susu sapi harus mendekati susunan zat gizi ASI (Dinkes Propinsi Sumatera Utara, 2005).

Susu formula bayi adalah susu yang dihasilkan oleh industri untuk keperluan asupan gizi yang diperlukan bayi. Susu formula kebanyakan tersedia dalam bentuk bubuk. Perlu dipahami susu cair steril sedang susu formula tidak steril (WHO, 2004).

Dibandingkan dengan ASI, susu formula memiliki banyak kelemahan terutama dalam hal kandungan gizinya. Selain itu penggunaan susu formula harus dikontrol dari kemungkinan masuknya organisme-organisme patogen atau terjadinya kontaminasi yang dapat menyebabkan diare. Untuk mencukupi kebutuhan bayi maka susu diberikan sesuai dengan takarannya. Takaran akan bertambah sesuai dengan bertambahnya umur bayi. Jadwal menyusui dengan susu formula tetap seperti pada bayi yang diberi ASI (Nadesul, 2005).

Perbedaan komposisi susu sapi dan komposisi ASI terdapat pada konsentrasi vitamin dan mineral yang lebih tinggi dan laktosa yang lebih rendah. ASI mengandung lebih banyak asam lemak tidak jenuh sehingga mudah dicerna sedangkan susu sapi tidak demikian. ASI mengandung lebih banyak asam linoleat, asam lemak yang esensial bagi manusia. Kandungan kolesterol ASI lebih tinggi jika dibandingkan kolesterol yang terdapat pada susu sapi. ASI mengandung cukup vitamin dan zat gizi yang dibutuhkan oleh bayi (Pudjadi, 2005).

1. Perbandingan Kandungan ASI dan Susu Formula (Obstetri Williams Volume 1 edisi 21)

Komposisi/100ml	ASI Matur	Susu Formula
Kalori	75	69
Protein	1,1	3,5
Air	87,1	87,3
Lemak	4,5	3,5
Karbohidrat	7,1	4,9
Mineral		
Na	16	50
K	53	144
Ca	33	118
P	14	93
Mg	4	13
Fe	0,05	Trace
Zn	0,15	0,4
Vitamin		
A	182	140
C	5	1
D	2,2	42
E	0,18	0,04
Tiamin	0,01	0,04
Ribovlavin	0,04	0,03
Niasin	0,2	0,17
pH	Basa	Asam
Kandungan Bakteri	Steril	Non Steril

Formula Bayi Untuk Keperluan Medis Khusus adalah formula pengganti ASI atau Formula Bayi yang diolah atau diformulasi secara khusus sebagai tatalaksana diet yang secara tunggal dapat memenuhi kebutuhan gizi bayi dengan gangguan, penyakit atau kondisi medis khusus selama beberapa bulan pertama kehidupannya sampai saat pengenalan makanan pendamping air susu ibu (MP-ASI) dan hanya boleh digunakan dibawah pengawasan tenaga medis (POM, 2009).

Mengacu pada Standardisasi Nasional Indonesia (SNI) 01-6366-2000 (Badan Standardisasi Nasional, 2000) ada empat macam susu yaitu susu segar, susu pasteurisasi, susu bubuk dan susu steril/UHT. Susu segar adalah cairan yang diperoleh dari ambing ternak perah sehat, dengan cara pemerahan yang benar, terus menerus dan tidak dikurangi sesuatu dan/atau ditambah kedalamnya sesuatu bahan lain. Setelah mendapat perlakuan terhadap susu segar diperoleh beberapa macam susu, antara lain lain:

- Susu pasteurisasi adalah susu yang sudah dipanaskan pada suhu 63°C selama 15 menit atau dipanaskan pada suhu 72°C selama 15 detik yang biasa disebut dengan HTST (*high temperature short time*) pasteurisasi. Proses pasteurisasi bertujuan untuk membunuh seluruh mikroorganisme baik pembusuk maupun patogen. Susu pasteurisasi memiliki umur simpan hanya sekitar 14 hari pada suhu rendah (5°C sampai 6°C).
- Susu bubuk adalah susu sapi yang telah diubah bentuknya menjadi bubuk dengan perlakuan pengeringan. Pada umumnya pengeringan dilakukan dengan menggunakan *spray dryer* atau *roller drayer*. Berdasarkan SNI 01-2970-1992 (Badan Standardisasi Nasional, 1992) ada 2 macam susu bubuk yaitu susu bubuk berlemak (*full cream milk powder*) dan susu bubuk tanpa lemak (*skim milk powder*). Umur simpan susu bubuk dalam penanganan yang baik dan benar maksimal dua tahun.
- Susu UHT (*ultra high temperature*) merupakan susu yang diolah menggunakan pemanasan pada suhu 135°C dan dalam waktu yang singkat selama 2-5 detik (SNI 01-3950-1998) (Badan Standardisasi Nasional, 1998). Pemanasan pada suhu tinggi bertujuan untuk membunuh seluruh mikroorganisme baik pembusuk maupun patogen dan spora. Waktu pemanasan yang singkat dimaksudkan untuk mencegah kerusakan nilai gizi susu

serta untuk mendapatkan warna, aroma dan rasa yang relatif tidak berubah seperti susu segarnya. Susu UHT dapat disimpan pada suhu kamar selama tidak lebih dari 8 minggu.

- Susu kental manis adalah cairan kental yang terdiri dari sebagian penambahan air dan susu encer yang diuapkan, gula, dengan atau tanpa penambahan lemak nabati dan atau penambahan vitamin D (SNI 01-2971-1992) (Badan Standardisasi Nasional, 1992).

Muchtadi (1994) menyatakan bahwa produk susu formula berupa tepung susu yang diformulasikan sedemikian rupa sehingga komposisinya mendekati ASI. Komposisi susu formula bervariasi tergantung pada industri pembuatannya. Di Indonesia beredar berbagai macam susu formula dengan berbagai merek dagang, akan tetapi dapat dibagi menjadi tiga golongan sebagai berikut:

1. Susu Formula “Adapted”

Adapted berarti disesuaikan dengan keadaan fisiologis bayi. Susu formula ini komposisinya sangat mendekati ASI sehingga cocok digunakan bagi bayi baru lahir sampai berumur 4 bulan.

2. Susu Formula “Complete Starting”

Susu formula ini susunan zat gizinya lengkap dan dapat diberikan sebagai formula permulaan. Kadar protein dan kadar mineral dalam susu formula ini lebih tinggi daripada susu formula adapted, karena cara pembuatannya lebih mudah dibandingkan dengan susu formula adapted, maka susu formula ini harganya lebih murah. Untuk menghemat, biasanya bayi diberikan susu formula adapted sampai berumur 3 bulan, kemudian dilanjutkan dengan susu formula ini.

3. Susu Formula Follow-up

Pengertian follow-up dalam susu formula ini adalah lanjutan, yaitu menggantikan susu formula yang sedang digunakan dengan susu formula ini. Susu formula ini diperuntukan untuk bayi berumur 6 bulan ke atas. Pada umumnya susu formula follow-up mengandung protein dan mineral yang lebih tinggi daripada susu formula adapted dan susu formula complete starting.

B. Jenis Mikroba yang Dapat Mencemari Susu

Mikroba pada susu formula

a. *Staphylococcus aureus*

Salah satu bakteri penyebab keracunan setelah minum susu adalah *S. aureus*. Di beberapa negara di Eropa, seperti Norwegia, *S. aureus* merupakan salah satu bakteri penyebab keracunan setelah minum susu (Jorgensen et al. 2005). Sumber-sumber *S. aureus* terdapat di sekitar kita, yaitu bagian permukaan kulit, mukosa mulut, hidung, dan kulit kepala. Pemeriksaan *S.aureus* dapat menggunakan metode isolasi dilanjutkan uji koaglutinasi plasma kelinci (AOAC, 1996).

b. *Salmonella sp.*

Salmonella sp. merupakan bakteri berbahaya yang dikeluarkan dari saluran pencernaan hewan dan manusia bersama dengan feses. *Salmonella enteritidis* merupakan salah satu serotipe yang sering mengontaminasi susu di samping *Salmonella typhimurium* (Sarati, 1999). Berdasarkan SNI 01-6366-2000, pemeriksaan *Salmonella sp.* dilakukan secara

kualitatif dan harus negatif. Salah satu metode untuk pemeriksaan *Salmonella sp.* adalah metode AOAC (1996).

c. *Escherichia coli*

E. coli termasuk bakteri berbahaya karena dapat menyebabkan diare. Salah satu syarat *E. coli* dalam SNI 01-6366-2000 harus negatif. Pemeriksaan *E. coli* dapat menggunakan metode AOAC (1996).

d. *Bacillus spp.*

Bacillus cereus merupakan salah satu spesies penyebab terjadinya *foodborne disease* (penyakit bawaan pangan). *B. cereus* dan *B. licheniformis* merupakan spesies dari genus *Bacillus* yang sering dijumpai pada susu segar (Crielly *et al.*, 1994; Phillips dan Griffiths, 1986). *B. cereus* menghasilkan toksin ekstraseluler dan metabolit yang membahayakan kesehatan masyarakat. Dua tipe toksin yang dihasilkan dan memiliki sifat yang berbeda yaitu *diarrhoeagenic toxin* dan *emetic toxin*. *Diarrhoeagenic toxin* sebagai penyebab keracunan makanan dapat diproduksi selama fase pertumbuhan di dalam usus kecil, sebaliknya *emetic toxin* diproduksi pada makanan sebelum di konsumsi (Granum dan Lund, 1997).

e. *Brucella spp.*

Beberapa spesies dari genus *Brucella* yang bersifat patogen pada manusia adalah *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* dan *B. canis* (Enright, 1990) dan memiliki hewan target sebagai *reservoir* masing-masing berurutan pada kambing, sapi, babi dan anjing (Alton, *et*

al., 1988). *Brucella* menyebabkan penyakit brucellosis yang dapat terjadi baik pada hewan maupun manusia. Penyakit yang terjadi bersifat zoonosis, ditularkan dari hewan ke manusia melalui kontak langsung dengan bahan keguguran, karkas yang tercemar, minum susu sapi atau susu hewan lain penderita brucellosis atau makan produk ternak yang tercemar (Fensterbank, 1987).

f. *Campylobacter spp.*

Di banyak negara sebagian besar kejadian infeksi yang disebabkan oleh cemaran *campylobacter* pada susu disebabkan oleh karena susu tidak dipasteurisasi (Hahn, 1994). *Campylobacter jejuni* dan *Campylobacter coli* tidak dapat mempertahankan hidup dengan perlakuan pasteurisasi (Wallace, 2003).

g. *Enterobacter sakazakii*

Enterobacter merupakan salah satu genus dari famili *Enterobacteriaceae* yang dikelompok ke dalam kelompok *coliform*. Menurut Nazarowwhite dan Farber (1997), diduga cemaran dalam produk asal susu terjadi selama proses pengeringan atau pengemasan. Terjadi kasus neonatal meningitis yang bersifat sporadik yang diakibatkan susu formula bayi yang mengandung bakteri *E. sakazakii* (Craven *et al.*, 2003). Walaupun demikian mengapa bakteri tersebut ada dan dapat bertahan didalam susu formula bayi tidak jelas (Breeuwer *et al.*, 2003).

h. *Listeria monocytogenes*

Keberadaan bakteri ini dalam susu kemungkinan akibat pencemaran baik dari hewan, manusia dan lingkungan selama proses produksi (Lovett et al., 1990).

i. *Mycobacterium spp.*

Menurut Katoch (2004) dalam genus *Mycobacterium* terdapat lebih dari 70 spesies, dan dari jumlah tersebut lebih dari 30 spesies diklasifikasikan sebagai patogen. Ditinjau dari segi kesehatan masyarakat spesies yang lebih umum dikenal adalah:

- *Mycobacterium tuberculosis*. Susu yang tidak dipasteurisasi dapat menjadi sarana penularan *M. tuberculosis* dari orang yang terinfeksi ke konsumen susu (Burton, 1986). Menurut Juffs dan Deeth (2007) *M. tuberculosis* masih tahan hidup setelah dipanaskan pada suhu 62⁰C selama 15 detik.
- *Mycobacterium bovis*. Bakteri disebarkan ke berbagai spesies lain termasuk manusia yang minum susu tidak dipasteurisasi atau menghirup/mengisap bakteri tersebut dari hewan penderita (Animal Health Australia, 2005). *M. bovis* tidak rusak jika dipanaskan pada suhu 62⁰C selama 15 detik.
- Spesies lain adalah *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (*Mycobacterium paratuberculosis*). Sumber infeksi adalah susu ternak yang sakit atau susu yang tercemar feces dari ternak penderita (Office Internaional of Epizooties, 2000). Menurut Juffs dan Deeth (2007). *M. paratuberculosis* tahan pada pemanasan suhu 62⁰C selama 15 detik.

j. *Streptococcus spp*

Streptococci sebagai penyebab infeksi oleh makanan telah ditetapkan sejak awal tahun 1900, ketika *scarlet fever* dan sakit tenggorokan setelah mengkonsumsi susu yang tercemar oleh *S. pyogenes* (*Lancefield Group A Streptococci*). Infeksi lain yang disebabkan oleh spesies tersebut termasuk tonsilitis, toksik shock sindrom, rematik akut dan glomerulonephritis. Spesies lain yang lebih dikenal di lingkup kesehatan masyarakat veteriner adalah *S. agalactiae* (*Lancefield Group B Streptococci*), penyebab utama mastitis pada sapi perah. Bakteri dapat dipindahkan ke manusia terutama ibu-ibu yang minum susu segar (*raw milk*) dan juga dihubungkan dengan kematian beberapa bayi penderita infeksi sepsis pada ileum setelah minum susu sapi segar (Thahir *et al.*, 2005).

k. *Yersinia enterocolitica*

Beberapa strain *Y. enterocolitica* telah diisolasi dari susu dan susu pasteurisasi di New South Wales (Hughes, 1979). Kemudian penelitian dilanjutkan untuk membuktikan bahwa keberadaan bakteri tersebut dalam susu yang sudah dipasteurisasi ternyata adalah merupakan kontaminasi setelah proses pasteurisasi karena bakteri tersebut bukanlah organisme yang tahan terhadap pasteurisasi (Hughes, 1980).

Tabel 2. Spesifikasi persyaratan mutu batas maksimum cemaran mikroba pada susu (dalam satuan CFU/gram atau ml)

Jenis Cemaran Mikroba	Batas Maksimum Cemaran Mikroba (BMCM)			
	Susu Segar	Susu Pateurisasi	Susu Bubuk	Susu steril/UHT
Jumlah total (ToTal Plate Count)	1×10^6	$<3 \times 10^4$	5×10^4	$<10/0,1$
<i>Coliform</i>	2×10^1	$<0,1 \times 10^1$	0	0
<i>Escherichia coli</i> (patogen) *	0	0	0	0
<i>Enterococci</i>	1×10^2	1×10^2	1×10^1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^2	1×10^1	1×10^1	0
<i>Clostridium sp</i>	0	0	0	0
<i>Salmonella sp</i> **	negatif	negatif	negatif	negatif
<i>Camphylobacter sp</i>	0	0	0	0
<i>Listeria sp</i>	0	0	0	0

Keterangan:

(*) : dalam satuan MPN /gram atau ml

(**) : dalam satuan kualitatif

(Standar Nasional Indonesia, 2000)

C. Air Minum

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 736/Menkes/PER/VI/2010, air minum adalah air yang melalui proses pengolahan atau tanpa proses pengolahan yang memenuhi syarat kesehatan dan dapat langsung diminum. Jenis air minum meliputi :

1. Air yang didistribusikan melalui pipa untuk keperluan rumah tangga
2. Air yang didistribusikan melalui tangki air
3. Air kemasan
4. Air yang digunakan untuk produksi bahan makanan dan minuman yang disajikan kepada masyarakat

Syarat-syarat air minum adalah tidak berwarna, tidak berasa, dan tidak berbau. Air minum pun seharusnya tidak mengandung kuman patogen yang dapat membahayakan kesehatan manusia. Tidak mengandung zat kimia yang dapat mengubah fungsi tubuh, tidak dapat diterima secara estetis, dan dapat merugikan secara ekonomis (Slamet, 2004). Air minum aman bagi kesehatan apabila memenuhi persyaratan fisika, mikrobiologis, kimiawi dan radioaktif yang dimuat dalam parameter wajib seperti pada tabel 3 (Menkes, 2002).

Penyakit yang Dapat Ditimbulkan oleh Air

Air merupakan suatu sarana utama untuk meningkatkan derajat kesehatan manusia, karena air merupakan salah satu media dalam berbagai macam penularan penyakit. Penyakit-penyakit yang berhubungan dengan air dapat dibagi dalam kelompok-kelompok berdasarkan cara penularannya. Mekanisme penularan penyakit sendiri terbagi menjadi empat, yaitu (Chandra, 2006):

1. *Water borne mechanism*

Penyakit pada mekanisme ini disebabkan oleh kuman patogen dalam air yang ditularkan kepada manusia melalui mulut atau sistem pencernaan. Contoh penyakit yang ditularkan melalui mekanisme ini antara lain kolera, tifoid, hepatitis viral, disentri basiler, dan poliomyelitis. Penyakit-penyakit ini hanya dapat menyebar apabila mikroba penyebabnya dapat masuk ke dalam sumber air yang dipakai masyarakat untuk memenuhi kebutuhan sehari-hari.

2. *Water washed mechanism*

Mekanisme penularan semacam ini berkaitan dengan kebersihan umum dan perorangan. Dengan terjaminnya kebersihan oleh tersedianya air yang cukup, maka penyakit-penyakit

tertentu dapat dikurangi penularannya pada manusia. Mutu air yang diperlukan tidak perlu seketat mutu air bersih untuk air minum, yang lebih menentukan dalam hal ini adalah banyaknya air yang tersedia. Pada mekanisme ini terdapat tiga cara penularan, yaitu:

- a. Infeksi melalui alat pencernaan, seperti diare pada anak-anak.
- b. Infeksi melalui kulit dan mata, seperti skabies dan trakhoma.
- c. Penularan melalui binatang pengerat seperti pada penyakit leptospirosis

3. *Water based mechanism*

Penyakit yang ditularkan dengan mekanisme ini memiliki agent penyebab yang menjalani sebagian siklus hidupnya di dalam tubuh vektor atau sebagai intermediate host yang hidup di dalam air. Contohnya skistosomiasis dan penyakit akibat *Dracunculus medinensis*. Badan-badan air yang potensial untuk menjangkitkan jenis penyakit ini adalah badan-badan air yang terdapat di alam, yang sering berhubungan erat dengan kehidupan sehari-hari manusia seperti menangkap ikan, mandi, cuci, dan sebagainya.

4. *Water related insect vector mechanism*

Agent penyakit ditularkan melalui gigitan serangga yang berkembang biak di dalam air. Contoh penyakit dengan mekanisme penularan semacam adalah filariasis, DBD, malaria, dan *yellow fever*. Nyamuk *aedes aegypti* yang merupakan vektor penyakit dengue dapat berkembang biak dengan mudah bila pada lingkungan terdapat tempat-tempat sementara untuk air bersih seperti gentong air, pot, dan sebagainya.

Tabel 3. Parameter wajib persyaratan air minum (Menkes, 2002)

No.	Jenis Parameter	Satuan	Kadar Maksimum yang Diperbolehkan
1.	Parameter yang berhubungan langsung dengan kesehatan		
	a. Parameter Mikrobiologis		
	1. <i>Escherichia coli</i>	Jumlah per 100ml sampel	0
	2. Total bakteri koliform	Jumlah per 100ml sampel	0
	b. Kimia anorganik		
	1. Arsen	mg/l	0,01
	2. Fluorida	mg/l	1,5
	3. Total Kromium	mg/l	0,05
	4. Kadmium	mg/l	0,003
	5. Nitrit, (sebagai NO ₂)	mg/l	3
	6. Nitrat, (sebagai NO ₃)	mg/l	50
	7. Sianida	mg/l	0,07uu
	8. Selenium	mg/l	0,01
2.	Parameter yang tidak berhubungan langsung dengan kesehatan		
	a. Parameter Fisik		
	1. Bau		Tidak berbau
	2. Warna	TCU	15
	3. Total Zat Padat Terlarut (TDS)	mg/dl	500
	4. Kekeruhan	NTU	5
	5. Rasa		Tidak berasa
	6. Suhu	°C	Suhu udara ± 3°C
	b. Parameter Kimiawi		
	1. Alumunium	mg/l	0,2
	2. Besi	mg/l	0,3
	3. Kepadatan	mg/l	500
	4. Klorida	mg/l	250
	5. Mangan	mg/l	0,4
	6. pH		6,5-8,5
	7. Seng	mg/l	3
	8. Sulfat	mg/l	250
	9. Tembaga	mg/l	2
	10. Amonia	mg/l	1,5

D. Metode MPN (*Most Probable Number*)

Metode MPN merupakan uji deret tabung yang menyuburkan pertumbuhan koliform sehingga diperoleh nilai untuk menduga jumlah koliform dalam sampel yang diuji. Jumlah koliform ini bukan penghitungan yang tepat namun merupakan angka yang mendekati jumlah yang sebenarnya (Lay, 2001).

Prinsip pengerjaan metode MPN ini adalah dengan melakukan Uji Penduga atau *Presumptive Test* dengan menggunakan set tabung 3-3-3 atau 5-5-5 kaldu laktosa, dilanjutkan Uji Penguat atau *Confirmed Test*, dan yang terakhir dilakukan Uji Pelengkap atau *Completed Test* (Novel dkk, 2010).

Dalam metode MPN digunakan media cair, berbeda dengan metode cawan yang menggunakan media padat atau Agar. Penghitungan dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif, yaitu yang ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung positif dapat dilihat dengan timbulnya kekeruhan atau terbentuk gas pada tabung Durham (Sutedjo, 1991).

Untuk mengetahui jumlah bakteri koliform umumnya digunakan tabel Hopkins atau tabel MPN yang dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah bakteri di dalam 100ml sampel air yang diteliti (Suriawiria, 2008).

Dari tabung yang positif terbentuk asam dan gas terutama pada masa inkubasi 1x24 jam, suspensi diinokulasikan pada media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) secara aseptik dengan menggunakan jarum inokulasi. Koloni bakteri *Escherichia coli* tumbuh berwarna merah kehijauan dengan kilap metalik atau koloni berwarna merah muda dengan lendir untuk kelompok koliform lainnya (Widiyanti, 2004).

Tabung yang memperlihatkan pembentukan gas diuji lebih lanjut dengan menggunakan uji penguat yang dilakukan untuk memperkuat dugaan bahwa gas yang terbentuk disebabkan oleh kuman koliform dan bukan disebabkan oleh kerja sama beberapa spesies sehingga menghasilkan gas. Untuk uji penguat dilakukan dengan menggunakan media *Brilliant Green Bile Lactose Broth* (BGLB) yang diinokulasikan dengan satu mata ose media dan diinkubasi pada suhu 35⁰C selama 48 jam (Lay, 2001).

Pengujian selanjutnya dilanjutkan dengan uji pelengkap untuk menentukan bakteri *Escherichia coli*. Dari koloni yang berwarna pada uji penguat diinokulasikan pada medium *Lactose Broth* dan medium agar miring Nutrient Agar (NA), dengan jarum inokulasi secara aseptik. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1x24 jam. Bila hasilnya positif terbentuk asam dan gas pada *Lactose Broth*, maka sampel positif mengandung *Escherichia coli*. Dari media agar miring NA dibuat pewarnaan gram dimana bakteri *Escherichia coli* merupakan gram negatif berbentuk batang pendek (Widiyanti, 2004).