

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Air

1. Pengertian air

Air merupakan sumber daya alam yang digunakan sebagai kebutuhan dasar bagi semua makhluk hidup. Air dapat berwujud padatan (es), cairan (air) dan gas (uap air). Satu-satunya yang dapat ditemukan di permukaan bumi dalam ketiga bentuknya adalah air. Air secara kimia diwakili oleh rumus H_2O . Ikatan kovalen digunakan untuk membuat molekul air dari dua atom hidrogen dan satu oksigen. Jika disimpan pada suhu dan tekanan ruangan, air kehilangan seluruh sifat sensoriknya, termasuk rasa, bau, dan warna (Udayani, 2018). Kualitas air berkaitan dengan terpenuhinya syarat-syarat mutu air bersih yang sudah ditetapkan dalam Permenkes No. 32 tahun 2017 tentang standar baku mutu kesehatan lingkungan dan persyaratan kesehatan air minum untuk keperluan higiene sanitasi, kolam renang, solus per aqua dan pemandian umum. Persyaratan air bersih tersebut meliputi persyaratan fisika, kimia, mikrobiologi dan radiologi.

2. Golongan air

Menurut Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 82 Tahun 2011 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air menyatakan penggolongan air menurut peruntukannya ditetapkan sebagai berikut:

Tabel 1
Penggolongan Air

Golongan A	Air yang digunakan sebagai air minum tanpa melalui pengolahan
Golongan B	Air yang digunakan sebagai air baku air minum
Golongan C	Air yang dapat dimanfaatkan untuk peternakan dan perikanan
Golongan D	Air tersedia untuk keperluan pertanian dan usaha perkotaan, industri dan pembangkit listrik tenaga air (PLTA)

3. Sumber air

Air sungai atau danau yang dianggap air permukaan digunakan sebagai sumber air. Karena kedalamannya, air tanah kadang-kadang disebut sebagai air tanah dangkal. Curah hujan yang bersifat aerosol, termasuk salju dan hujan, dikenal sebagai air luar angkasa. Faktor alam dan manusia di suatu daerah menentukan kualitas air dari berbagai sumber. Dalam lingkungan yang tidak tercemar, sumber air permukaan dan air tanah dangkal dapat menghasilkan air yang dapat diminum. Akibatnya, terdapat perbedaan besar antara air permukaan dan air tanah dangkal.

a. Air permukaan

Air permukaan merupakan air permukaan yang dihasilkan dari air hujan yang turun pada permukaan tanah melalui dua proses yaitu (Ameilia, 2018):

- 1) Limpasan permukaan dari daratan mengisi danau dan mengalir ke daerah dataran rendah melalui sungai yang akhirnya bermuara ke laut. Lautan, sungai, dan danau merupakan sumber air permukaan.

2) Menciptakan jalur bagi air tanah untuk meresap ke dalam tanah. Secara umum, air permukaan tidak terkontaminasi bakteri atau bahan kimia, berbau tidak sedap, dan biasanya kotor. Biasanya *fast sand filter* atau *slow sand filter* akan digunakan untuk memurnikan air permukaan. PDAM (Perusahaan Air Minum Provinsi) biasanya menggunakan penyaring pasir berkecepatan tinggi dalam skala besar, sedangkan masyarakat dan rumah tangga biasanya menggunakan penyaring pasir lambat dalam skala yang lebih kecil.

b. Air tanah

Air tanah merupakan air yang terdapat pada pori-pori tanah dan retakan-retakan di dalam tanah (Zahara, 2018). Primawati (2016) menyatakan bahwa jenis lapisan tanah berbeda-beda:

- 1) Air dari dalam tanah yang kedalamannya mencapai lima meter. Airnya umumnya berkualitas tinggi, meski berubah seiring musim. Beberapa bakteri mampu bertahan hidup di air yang meresap ke dalam tanah dan lumpur sehingga menghasilkan air tanah yang dangkal.
- 2) Air dari kedalaman 100 hingga 300 meter yang diambil menggunakan bor atau pipa disebut dengan air tanah dalam. Air ini lebih unggul kualitasnya dibandingkan air tanah dangkal, memiliki konsentrasi bakteri yang rendah, dan komposisi kimianya berubah seiring pergerakannya melalui berbagai lapisan tanah.
- 1) Mata air adalah air dalam bawah tanah yang secara alami muncul ke permukaan bumi. Kualitas air ini setara dengan air tanah dalam.

B. Tinjauan Air Minum

1. Defenisi air minum

Menurut Peraturan Nomor 492/MENKES/Per/IV/2010 tentang persyaratan kualitas air minum, air dianggap layak dikonsumsi manusia apabila memenuhi baku mutu fisika, kimia, mikrobiologi, dan radioaktif, hal ini berlaku terlepas dari apakah air tersebut telah diolah atau belum. Menurut Keputusan Nomor 651/MPP/Kep/10/2004 yang merupakan bagian dari Peraturan Negara Republik Indonesia, air minum diartikan sebagai air mentah yang telah diolah sehingga aman untuk dikonsumsi manusia. Stasiun pengisian ulang air minum memproses airnya menggunakan ozonasi, sinar ultraviolet (UV), dan *reversed osmosis* (RO). Selain bebas mineral, air yang layak dikonsumsi manusia harus jernih, bebas bau, tidak berasa, tidak berwarna, dan netral dengan pH 7.

2. Manfaat air minum

Sekitar 65–70% tubuh manusia terdiri dari air, sehingga jelas bahwa air sangat penting bagi kehidupan. Manusia bisa bertahan berbulan-bulan tanpa makan, tapi tidak akan bisa bertahan lebih dari satu atau dua hari tanpa air. Rasa haus dapat disebabkan oleh kekurangan air sebesar 1-2 %, halusinasi sebesar 5%, dan kematian sebesar 10-12 %.

Air membantu pengangkutan produk pencernaan ke organ tubuh dan berfungsi sebagai pelarut universal. Darah 90% terdiri dari air membawa nutrisi ke berbagai sel, karbon dioksida (CO₂) ke paru-paru, dan garam ke ginjal. Urin terutama terdiri dari 97% air, dengan sejumlah kecil produk limbah metabolisme yang dikeluarkan tubuh. Banyak reaksi biokimia,

termasuk reaksi pemecahan gula dan lemak menjadi bagian-bagian komponennya, memerlukan air sebagai pelarut. Selain itu, air mengurangi gesekan antar sendi sehingga dapat bergerak lebih leluasa. Pengeringan kulit dan paru-paru juga berperan dalam menjaga suhu inti tubuh tetap konstan. (Nursyafitri, 2015).

3. Penyakit akibat kontaminasi air minum

Persediaan air yang tidak memadai dapat menyebabkan berbagai macam penyakit, beberapa di antaranya dapat menyebar melalui (Salsabila, 2023) :

- a. *Water borne disease* merupakan penyakit yang ditularkan melalui air. Air yang terkontaminasi mikroorganisme atau patogen penyebab penyakit seperti diare, tipus, dan leptospirosis dapat menyebar melalui air karena sejumlah faktor, termasuk cara pemisahan kotoran manusia dan hewan dari air, praktik sanitasi, dan ketersediaan air bersih untuk kebersihan pribadi dan mencuci tangan.
- b. *Wate washed disease* merupakan suatu kondisi yang timbul karena kurangnya kebersihan air. Penularannya dapat terjadi melalui infeksi saluran cerna seperti diare, infeksi kulit atau mata seperti kudis dan trachoma, atau penyakit yang ditularkan melalui urin seperti leptospirosis.
- c. *Water based disease* disebabkan oleh patogen parasit yang tumbuh subur di air dan menginfeksi inangnya, sehingga menyebabkan penyakit seperti schistosomiasis dan dracunculiasis.
- d. *Water Related Vectors* merupakan agen infeksi yang ditularkan melalui serangga atau vektor yang berkembang biak di air dan dapat menyebabkan penyakit seperti demam berdarah, malaria, dan filariasis.

C. Sumber Air Terkontaminasi

Sumber air terkontaminasi mengacu pada sumber air baku yang telah tercemar oleh bakteri, virus, patogen, parasit, bahan kimia, radioaktif, dan zat lainnya. Pencemaran air dapat timbul dari dua sumber yang berbeda yaitu kontaminasi langsung dan kontaminasi tidak langsung.

1. Sumber kontaminasi langsung

Sumber pencemaran langsung dicirikan oleh lokasinya yang spesifik dan berasal dari titik tertentu di sepanjang aliran air. Pencemaran lokasi terutama timbul dari pengolahan limbah yang tidak memadai di pipa pengolahan limbah industri atau pembuangan limbah yang tidak diolah dengan benar dari Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) ke badan air (Sarminingsih, 2014).

2. Sumber kontaminasi tidak langsung

Menurut Irsanda (2014), kontaminasi tidak langsung berasal dari barang konsumsi yang berasal dari pertanian, peternakan, usaha kecil, kegiatan rumah tangga, dan bidang lain.

D. Air Minum Dalam Kemasan (AMDK)

1. Defenisi air minum dalam kemasan

Air mineral dan air demineralisasi merupakan contoh air mentah yang telah diolah dan dikemas sehingga aman untuk diminum dengan memenuhi standar fisika, kimia, dan mikrobiologi (Permenkes, 2010). Sebelum siap dikemas dan dikirim ke pelanggan, air kemasan melalui serangkaian proses antara lain pengendapan, filtrasi multimedia, pelunakan, filtrasi mikro, ultra

filtrasi, dan pengolahan dengan teknik *Reverse Osmosis* (RO) (Wardana, 2018).

2. Syarat air minum

Persyaratan kualitas air dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 492/MENKES/Per/IV/2010 dipenuhi melalui pemeriksaan sifat fisika, kimia, mikrobiologi, dan radiologi untuk ditetapkan sebagai air minum. Tabel 2 di bawah mencantumkan parameter wajib dan tambahan untuk persyaratan kualitas air minum.

Tabel 2.
Parameter Wajib dan Tambahan Kualitas Air Minum

No	Jenis Parameter	Satuan	Kadar maksimum yang diperbolehkan
1	Parameter yang berhubungan langsung dengan kesehatan		
	a. Parameter Mikrobiologi		
	1) <i>Escherichia coli</i>	Jumlah per 100 ml sampel	0
	2) Total Bakteri Koliform	Jumlah per 100 ml sampel	0
	b. Kimia an-organik		
	1) Arsen	mg/1	0,01
	2) Fluorida	mg/1	1,5
	3) Total Kromium	mg/1	0,05
	4) Kadmium	mg/1	0,003
	5) Nitrit (NO ₂ ⁻)	mg/1	3
	6) Nitrat (NO ₃ ⁻)	mg/1	50
	7) Sianida	mg/1	0,07
	8) Selenium	mg/1	0,01
2	Parameter yang tidak langsung berhubungan dengan kesehatan		
	a. Parameter Fisik		
	1) Bau		Tidak berbau
	2) Warna	TCU	15
	3) Total zat padat terlarut (TDS)	mg/1	500
	4) Kekeruhan	NTU	5
	5) Rasa		Tidak berasa
	6) Suhu	DC	suhu udara ± 3
	b. Parameter Kimiawi		
	1) Aluminium	mg/1	0,2
	2) Besi	mg/1	0,3
	3) Kesadahan	mg/1	500
	4) Klorida	mg/1	250
	5) Mangan	mg/1	0,4
	6) pH		6,5-8,5
	7) Seng	mg/1	3
	8) Sulfat	mg/1	250
	9) Tembaga	mg/1	2
	10) Anomalia		1,5
	c. Parameter Radioaktifitas		
	1) Gross alpha activity	Bq/1	0,1
	2) Gross beta activity	Bq/1	1

Permenkes No. 492/MENKES/Per/IV/2010 Tentang Kualitas Air Minum

E. Depot Air Minum Isi Ulang (DAMIU)

1. Defenisi depot air minum isi ulang

Air minum isi ulang (AMIU) merupakan air minum yang telah melewati proses pengolahan air baku melalui beberapa tahapan yang meliputi penjernihan, filtrasi, proses desinfeksi menggunakan sinar *ultraviolet*, *ozon* atau *reverse osmosis* dan pengisian ulang kedalam tempat galon air minum. Air minum isi ulang biasanya bersumber dari air tanah. Air tanah kaya akan mineral dan warna kuning kecoklatan. Oleh karena itu diperlukan pengolahan sebelum minum (Permenkes, No. 492/MENKES/Per/IV/2010 mengenai persyaratan kualitas air minum).

2. Higiene sanitasi depot air minum

Tujuan utama dari kebersihan sanitasi adalah untuk memastikan bahwa air minum bebas dari kontaminan dengan mengurangi potensi sumber kontaminasi di lokasi, pada peralatan, dan dalam proses pengolahan air. Sesuai Perda Kotabaru Kalimantan Selatan Nomor 02 Tahun 2015, bangunan DAMIU wajib memenuhi standar sanitasi tertentu:

- a. Tempat pembuangan sampah tidak boleh terlalu dekat dengan lokasi pembangunan. Bagian luar depo terbuat dari kaca tembus pandang dengan pintu tembus pandang. Bangunan gedung mempunyai luas lantai minimal 2m x 4m, dinding rata, bersih, dan halus; lantai bersih, kering, dan tidak licin; dan dindingnya kedap air. Warna lantainya cerah. Ventilasi memadai, tinggi plafon minimal 2,4 meter, ruangan bersih bebas serangga dan hewan pengerat, serta tidak terdapat lubang pada struktur. Tersedia tempat khusus untuk mengisi dan mencuci galon, wastafel, tempat cuci

tangan dengan sabun disinfektan, serta rak jemur dan lap. Termasuk tempat sampah dengan penutup dan konstruksi tahan air; pengiriman dijamin dalam waktu 24 jam.

- b. Bangunan depo untuk mengisi ulang air minum dilarang untuk hewan peliharaan. Pemilik usaha atau pekerja bersama perusahaan harus mengenakan sandal yang bersih dan selalu menyimpannya di dalam ruangan.
- c. Pelanggan diminta untuk tidak memakai sandal atau sepatu dari luar ruangan saat membeli air, kecuali jika penjaga toko memiliki sandal yang bersih.

3. Personal hygiene operator depot air minum

Menurut Perda Kotabaru, Kalimantan Selatan, No. 02 tahun 2015, semua karyawan yang bekerja pada depot air minum wajib menjaga kebersihan diri. Kebersihan kerja meliputi meliputi :

- a. Selalu menggunakan sabun atau disinfektan untuk mencuci tangan sebelum dan sesudah memegang galon air minum.
- b. Jangan merokok atau mempunyai kuku yang panjang atau mengecatnya ketika bekerja.
- c. Jangan makan atau minum di depot air isi ulang, saat sedang bekerja.
- d. Rambut harus bersih bila panjang harus diikat dengan baik atau ditutup dengan topi, dan tidak dalam keadaan sakit, terluka, atau tertular penyakit menular. Jangan berbicara saat mengisi air minum atau memakai masker

4. Peralatan pengolahan depot air minum

a. Peralatan produksi depot air minum

- 1) Meliputi minimal 2 (dua) tempat penampungan air baku serta alat penyaring dan penjernihan.
- 2) Sistem dua kartrid yang menggunakan sinar ozon dan ultraviolet untuk desinfeksi.
- 3) Tidak perlu selang karena mesin cuci galon dilengkapi dengan sabun cuci antiseptik dan keran pengisian galon.

b. Sanitasi peralatan

- 1) Tangki tidak boleh ditempatkan di tempat yang terkena sinar matahari langsung karena dibuat dari bahan food grade.
- 2) Reservoir dihubungkan dengan katup pembuka dan penutup, dan Tangki 1 terletak di atas Tangki 2. Penting untuk diingat untuk menutup keran di wadah 2 setelah diisi dengan air. Setelah memeriksa kualitas air dan menunggu 6 jam keran air bisa dibuka.
- 3) Saringan dan purifer yang digunakan terbuat dari bahan yang aman untuk Filter dan pembersih mengandung pasir silika dan karbon aktif.
- 4) 10, 5, 1, dan 0,5 μm merupakan ukuran *Medium Cartridge* dan *Finishing Cartridge* yang digunakan. Disarankan untuk mengganti kartrid setidaknya setiap lima belas hari sekali.
- 5) Peralatan wajib dicuci setiap 10 (sepuluh) hari sekali.

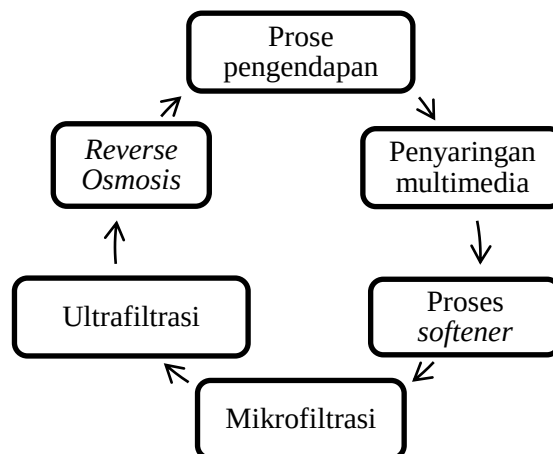
c. *Higiene* peralatan

- 1) Galon pembeli harus dibersihkan terlebih dahulu sebelum diisi dengan air minum produksi

- 2) Lap bagian luar galon dengan kain bersih sebelum mencuci bagian dalam galon
- 3) Membersihkan dengan alat khusus pembersih galon dengan menggunakan sabun cuci disinfektan. Bilas terakhir dilakukan dengan air murni produksi
- 4) Galon setelah diisi harus segera ditutup dan pembeli harus diberikan tisu alkohol untuk membuka tutup galon.

F. Proses Pengelolahan Air Minum Dalam Kemasan

Menurut Wardana (2018), ada beberapa metode untuk pengolahan dan pemurnian air yang layak untuk diminum, yaitu seperti gambar dibawah :



Gambar 1. Proses pengolahan air minum

1. Air yang telah diolah diendapkan dalam jangka waktu singkat dan kemudian dikeluarkan dari permukaan beberapa sentimeter selama proses pengendapan (Collivignarelli dkk., 2017).
2. Multimedia, yaitu menyaring air dengan menggunakan berbagai media seperti batu, pasir, dan kerikil.

3. Proses *softene*, dilakukan dengan menggunakan bahan pemlastis seperti *Anion Exchange*. Dalam pengolahan air, hal ini bertujuan untuk mengurangi kandungan ion bebas dalam air (Goh dkk., 2016).
4. Penyaringan mikro, yaitu penggunaan filter yang seribu kali lebih kecil dibandingkan filter multimedia (Moentamaria dkk., 2022).
5. Ultrafiltrasi, yaitu penggunaan saringan yang seribu kali lebih kecil dari mikrofiltrasi.
6. Teknologi reverse osmosis (RO) menggunakan membran semipermeabel untuk menyaring hingga 99% bakteri, memurnikan air dan menjadikannya air yang dapat diminum dengan lebih sedikit kontaminan (Manamperuma dkk, 2019).

G. Bakteri *Coliform*

1. *Coliform*

Basil yang tidak memiliki spora motil dikenal sebagai *Coliform* dan bakteri ini dapat memfermentasi laktosa menjadi gas dan asam hanya dalam waktu 48 jam pada suhu 37°C. *Coliform* berfungsi sebagai penanda keberadaan mikroba berbahaya. Keberadaan virus, protozoa, dan parasit di dalam air dapat dideteksi oleh mikroba tersebut. Bakteri ini tidak hanya mudah diisolasi dan dibudidayakan, tetapi juga memiliki ketahanan yang lebih tinggi dibandingkan patogen. Salah satu faktor yang paling signifikan mempengaruhi kualitas air adalah keberadaan bakteri *Coliform*. Kualitas air berbanding lurus dengan jumlah bakteri *Coliform* yang dikandungnya. Sebaliknya menurut Meylani (2019), kualitas air menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi *Coliform* di dalamnya.

Berikut adalah dua kategori utama *Coliform* yaitu *Coliform* non-fekal dan *Coliform* fekal :

- a. Keberadaan bakteri patogen berkorelasi positif dengan jumlah koloni bakteri *Coliform fecal* sehingga menjadi indikator kontaminasi bakteri. Penyakit pada sistem pencernaan dapat disebabkan oleh bakteri *Coliform fecal* tertentu, khususnya *Escherichia coli*, yang dapat ditemukan pada kotoran manusia dan hewan. Karena letaknya yang dekat dengan kotoran usus manusia, keberadaan bakteri *Coliform fecal* pada sampel menunjukkan bahwa tahap pengisian air minum tidak higienis (Sunarti, 2016)
- b. Bakteri *coliform non fecal* merupakan bakteri yang bukan berasal dari tinja manusia, tetapi ditemukan pada hewan dan tumbuhan yang sudah mati sehingga dapat menyebabkan penyakit saluran pernafasan. Tipe bakteri non fecal yaitu *Enterobacter aerogenes* dan *klebsiella* (Jirna, 2015).

2. Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* terdapat dalam sistem pencernaan hewan dan manusia dan diketahui menyebabkan berbagai gejala, termasuk diare, demam, sakit perut, dan muntah. Bakteri gram negatif dan bakteri berbentuk batang lainnya dapat hidup sendiri atau berkoloni, biasanya bergerak, tidak menghasilkan spora, dan bersifat anaerob fakultatif. Pengukurannya berkisar antara $0,4-0,7 \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$. (Bambang, 2014).

Karena kemampuannya mendeteksi kontaminasi pada makanan dan minuman, keberadaan *Escherichia coli* di usus manusia dapat menjadi parameter penentuan kesesuaian air minum dan indikator kebersihan.

Menelan makanan atau minuman yang tercemar atau bersentuhan dengan hewan, kotoran, atau kotoran yang terinfeksi adalah cara *Escherichia coli* ditularkan ke manusia melalui jalur *fecal-oral*. *Escherichia coli* dapat masuk ke dalam tubuh melalui perilaku tidak bersih, terutama setelah menggunakan kamar kecil. (Deepesh dkk, 2013).

Ketika laktosa difermentasi menjadi asam laktat dalam tabung Durham, keberadaan *Escherichia coli* ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas dan munculnya warna keruh. Peningkatan asam menyebabkan komponen laktosa menggumpal dan menimbulkan kekeruhan. Sedangkan fermentasi laktosa menghasilkan gas karbon dioksida yang menjadi sumber gelembung gas pada tabung Durham (Fridayanti, 2022).

H. Uji Kualitas Bakteriologi Pada Air Minum

Metode MPN (*Most Probable Number*) digunakan untuk menilai kualitas bakteriologis air minum. Jumlah bakteri *Coliform* pada pengujian kualitas air dipastikan menggunakan metode MPN. Menurut Riski dkk. (2013), prinsip pengujian MPN adalah mengencerkan sampel sampai batas yang telah ditentukan agar diperoleh konsentrasi mikroba yang tepat. Jika mikroorganisme tumbuh di tabung Durham dan terbentuk gas dinyatakan positif. Piruvat dan asam asetat dihasilkan dari aktivitas fermentasi gula yang menghasilkan reaksi positif. Gelembung karbon dioksida tercipta dari reaksi anaerobik ini, dan gelembung ini menekan ruang tabung Durham yang terbalik. Lebih banyak ruang gas akan terbentuk di dalam tabung Durham dan reaksi positif akan terjadi jika berlangsung lebih dari 24 jam. Reaksi negatif

tidak menunjukkan adanya bakteri, hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya gelembung yang terbentuk pada tabung Durham (Putri, 2018).

Dalam pemeriksaan MPN terdapat macam-macam ragam yang digunakan, sebagai berikut (Soemarno, 2002):

1. Ragam 3.3.3 (3 x 10 mL, 3 x 1 mL, 3 x 0,1 mL)

Ragam yang digunakan untuk pemeriksaan menggunakan sampel air keran atau sampel yang belum diolah.

2. Ragam 5.1.1 (5 x 10 mL, 5 x 1 mL, 5 x 0,1 mL)

Ragam yang digunakan untuk air yang telah diolah atau memiliki kandungan bakteri yang rendah, seperti air minum dalam kemasan atau air minum isi ulang.

3. Ragam 5.5.5 (5 x 10 mL, 5 x 1 mL, 5 x 0,1 mL)

Ragam yang digunakan untuk air yang tidak diolah atau air yang bakterinya tinggi contohnya air sumur, sungai.

Pemeriksaan MPN meliputi tiga tahapan yaitu tes pendugaan (*presumptive test*), tes penegasan (*confirmed test*), dan tes pelengkap (*completed test*).

1. Uji pendugaan

Uji pendugaan dilakukan dengan inokulasi pada media *Lactose Bile Broth* untuk memperkirakan gelembung gas tabung Durham setelah 24 jam pada suhu 37°C. Jika tidak terbentuk gelembung gas setelah 24 jam, maka hasilnya dinyatakan negatif dan tidak perlu dilanjutkan dengan uji penegasan (Sunarti, 2015).

2. Uji penegasan

Uji penegasan merupakan uji lanjutan dari uji pendugaan pada sampel positif Coliform. Pengujian ini melibatkan inokulasi *Brilliant Green Bile Broth* (BGLB) dengan media positif pada suhu 37°C (untuk *Coliform*) dan 44°C (untuk *Escherichia coli*) dan inkubasi selama 24–48 jam. Gelembung gas pada tabung Durham menunjukkan bahwa jumlah sampel positif sesuai dengan indeks MPN (Lampiran 1).

3. Uji pelengkap

Uji pelengkap menggunakan pewarnaan Gram untuk mendeteksi *Escherichia coli* pada koloni media EMB. Koloni hijau metalik menjadi ciri pertumbuhan *Escherichia coli*. Jika dilihat di bawah mikroskop, bakteri tersebut berbentuk batang, Gram negatif, dan tidak mempunyai spora. (Sari, 2019)