

EVALUASI MEDIUM PENGAYAAN *Vibrio cholerae* UNTUK DIAGNOSIS KOLERA MENGGUNAKAN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC STRIP TEST

Kambang Sariadji*, Sunarno, Nelly P, Melati Wati, Khariri,
Sundari N.S dan Novi Amalia

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

* E-mail : Kambang_sar@yahoo.com

EVALUATION OF *Vibrio cholerae* ENRICHMENTS MEDIA FOR CHOLERA DIAGNOSIS BY IMMUNOCHROMATOGRAPHIC STRIP TEST

Abstract.

Vibrio cholerae strains are capable of causing outbreak cholera in developing country with poor sanitation and hygiene .Conventional culture methods currently available for detection of *V. cholerae* O1 takes 3 – 5 days. Other diagnostic tools are by using rapid immunochromatographic strip test for controlling and preventing the spreading of cholera outbreak. This method has limitation in detection of *V.cholerae* O1, especially under 10^5 cfu/mL. Furthermore rapid method can be improved by enrichment media and incubation in 37° C for 6 – 8 hours. The aims of research are to analyse enrichments media in increasing *V.cholerae* O1, and it's to improve the finding of the laboratory diagnosis of cholera cases. The research was conducted at the Laboratory of Bacteriology, Center of Biomedical and Basic Technology of Health National Institute of Health Research and Development (NIHRD) from January - July 2011. Medium evaluation was done by making serial dilutions of *Vibrio cholerae* O1 from 10^7 - 10^1 cfu / ml inoculated into three mediums: alkaline peptone water, bismuth sulfite, and gelatin phosphate salt broth medium. Then were incubated 37° C for 8 hours and every two hours was tested by immunochromatographic strip test. The data analysis to determine treatment and individual differences each group was done by one way ANOVA test.

The results showed that alkali peptone water are better than gelatine phosphate salt broth and bismuth sulfite in increasing *V.cholerae* O1, p.value 0.000 means significant different. Meanwhile from 24 samples dilutions which were inoculated in three enrichment media, and detected by rapid immunochromatographic in every 2 hours for 8 hours showed positive result in enrichments media are 17 samples for alkali peptone water, 13 samples for gelatine phosphate salt broth and 8 samples for bismuth sulfite.

Key Words : *V.Cholerae, Enrichment Media, Immunochromatographic strip test*

Abstrak.

Vibrio cholerae O1 adalah bakteri yang dapat menimbulkan wabah kolera pada negara berkembang dengan tingkat sanitasi dan higiene yang buruk .Saat ini metode baku diagnosis bakteri *V.cholerae* O1 adalah dengan kultur dan isolasi yang memerlukan waktu 5 hari. Diagnosis lain untuk menanggulangi dan mencegah penyebaran wabah kolera dengan metode rapid imunokromatografi strip test. Metode rapid ini

mempunyai keterbatasan mendeteksi jumlah *V.cholerae* O1 minimal 10^5 cfu/mL dan dapat ditingkatkan dengan medium pengayaan yang diinkubasi selama 6 - 8 jam pada suhu 37°C . Penelitian bertujuan untuk menganalisis medium pengayaan dalam meningkatkan jumlah *V.cholerae* O, sehingga diagnosis laboratorium untuk meningkatkan temuan kasus penyakit kolera dapat ditingkatkan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes dari bulan Januari – Juli 2011. Evaluasi medium ini dilakukan dengan cara membuat pengenceran serial *cholerae* O1 dari 10^6 - 10^1 cfu/mL yang dinokulasikan ke tiga medium tersebut yakni air peptone alkali, *bismuth sulfite*, dan medium gelatin phosphate salt broth. Kemudian diinkubasi pada 37°C selama 8 jam dan setiap 2 jam dilakukan pengujian dengan menggunakan *immunochromatographic strip test*. Analisis data untuk mengetahui perlakuan dan perbedaan masing – masing kelompok dilakukan dengan uji *one way anova*. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada medium air peptone alkali lebih baik dibandingkan dengan medium gelatine phosphate salt broth dan *bismuth sulfite*. Pada uji beda rata – rata nilai *p.value* adalah 0,000. Sementara dari 24 sampel pengenceran yang diinokulasikan ke tiga medium pengayaan dan dideteksi dengan metode rapid menunjukkan hasil deteksi positif pada medium air peptone alkali adalah 17, lebih banyak dibandingkan medium gelatine phosphate salt broth sebanyak 13 dan medium *bismuth sulfite* sebanyak 8.

Kata Kunci : *V.cholerae*, Medium Pengayaan, *Immunokromatografi strip test*

PENDAHULUAN

Vibrio cholerae O1 adalah bakteri gram negatif yang dapat menimbulkan wabah kolera di negara berkembang dengan tingkat sanitasi dan higiene yang buruk termasuk Indonesia. Gejala yang ditimbulkannya meliputi muntah, buang air besar seperti air beras dalam jumlah banyak (1 liter/jam) sehingga mengakibatkan dehidrasi, kehilangan elektrolit dan naiknya keasaman darah. Pada kasus yang berat, penderita kehilangan cairan serta elektrolit dengan cepat dan banyak sehingga terjadi renjatan keasaman metabolik dan bila tidak diobati akan menyebabkan kematian.^(1, 2)

Saat ini metode pemeriksaan laboratorium yang digunakan untuk mendukung diagnosis *V.cholerae* O1 adalah dengan cara konvensional (kultur dan isolasi bakteri) yang memerlukan waktu 3 - 5 hari.⁽³⁾ Pada kasus terjadinya wabah kolera, diagnosis laboratorium lainnya yang digunakan adalah dengan metode rapid *Immunokromatografi strip test* yang memerlukan waktu 15 – 20

menit, murah, mudah dan cepat. Metode rapid *Immunokromatografi strip test* ini digunakan untuk mengontrol dan mencegah penyebaran wabah kolera serta untuk kepentingan surveilans penyakit. Namun demikian metode rapid ini mempunyai kelemahan yakni memerlukan sedikitnya 10^5 cfu/mL sel bakteri agar memberikan deteksi hasil positif. Untuk mendapatkan hasil yang optimal deteksi temuan kasus kolera maka diperlukan perbanyakan bakteri *V.cholerae* O1 terlebih dahulu dengan cara menginokulasikan spesimen ke medium pengayaan dan diinkubasi 6 – 8 jam pada suhu 37°C .^(3, 4)

Saat ini medium air pepton alkali digunakan sebagai medium pengayaan bakteri *Vibrio cholerae* dengan pH 9,1 suhu 37°C , namun kecepatan dalam memperbanyak jumlah sel bakteri masih belum diketahui. Beberapa medium lain yang juga digunakan untuk meningkatkan jumlah *V.cholerae* O1 adalah medium air pepton alkali dengan penambahan komponen *bismuth sulfite* (pH

9.1) serta medium gelatin phosphate salt broth (pH 7.6). Medium tersebut juga belum diketahui efektifitasnya dalam meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae*.^(5,6)

Oleh sebab itu dievaluasi tiga jenis medium pengayaan dalam meningkatkan jumlah bakteri *V.cholerae* O1. Peningkatan konsentrasi jumlah bakteri dengan menggunakan medium pengayaan ini diharapkan dapat meningkatkan batas minimal deteksi dengan Immunochromatographic strip test yakni $> 10^5$ cfu/mL sehingga diagnosis laboratorium metode rapid immunokromatografi strip test dapat lebih akurat.

BAHAN DAN METODA

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, pada bulan Januari – April 2011. Bakteri yang digunakan adalah salah satu isolat *cholerae* O1 yang berasal dari kasus kejadian luar biasa di Papua kabupaten Nabire dan Paniai pada tahun 2008.

Ada tiga jenis medium yang digunakan sebagai medium pengayaan bakteri *cholerae* yakni medium air peptone alkali (Lesmana).^(7,8), medium Bismuth sulfite (Wilson dan Reilly)⁽⁶⁾, *medium Gelatine Phosphate Salt Broth* (Pronadisa).⁽⁹⁾ Sementara pada pengujian menggunakan rapid immunokromatografi untuk mendeteksi *Vibrio cholerae* O1 digunakan produk berbentuk strip bernama Crystal VC berasal Span diagnostik, India. Penggunaan rapid test dengan cara mencelupkan strip ke dalam sampel, kemudian hasilnya dibaca 15 – 20 menit dengan terbentuknya pita pada strip dalam waktu. Hasil positif *V.cholerae* O1 terbentuk dua pita, sementara hasil negatif terbentuk satu pita.⁽¹⁰⁾

Prosedur Penelitian

Bakteri *V.cholerae* O1 dari stock isolat dihidupkan kembali dengan cara kultur, isolasi dan identifikasi pada medium selektif, kemudian dengan menggunakan nefelometer dibuat suspensi bakteri *V.cholerae* O1 dengan konsentrasi 0,5 MacFarland yang setara dengan 10^7 cfu/mL. Selanjutnya dari konsentrasi 0,5 Macfarland tersebut dibuat pengenceran dari pengenceran $10^7 - 10^1$ cfu/mL.⁸ Masing – masing pengenceran diambil 2 ml dan diinokulasikan ke tiga medium pengayaan untuk dibandingkan tingkat pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 yakni medium air pepton alkali, medium kombinasi air peptone alkali dengan bismuth sulfite dan medium gelatine phosphate salt broth. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Setiap 2 jam dilakukan pengukuran jumlah bakteri pada masing – masing medium pengayaan dengan menggunakan alat nefelometer dan dilakukan pengujian adanya *V.cholerae* O1 dengan menggunakan metode rapid Immunokromatografi strip test. Total pemeriksaan dari pengenceran tersebut berjumlah 24 (pengenceran $10^6 - 10^1$ berjumlah 6, dan tiap 2 jam dilakukan pengukuran konsentrasi sebanyak 4 kali) untuk tiap – tiap medium pengayaan. Adapun deteksi *V.cholerae* O1 dilakukan dengan cara mencelupkan strip test ke dalam tabung yang berisi medium, kemudian dibaca hasilnya dengan terbentuknya pita pada strip dalam waktu 15 – 20 menit. Hasil positif terbentuk dua pita sementara hasil negatif terbentuk satu pita.⁽¹⁰⁾

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan menggunakan piranti lunak SPSS 16 (*one-way anova*) untuk mengetahui secara statistik jenis medium pengayaan yang memberikan hasil pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 yang lebih cepat. Sehingga batas limit deteksi bakteri dengan menggunakan immunochromatographic strip test dapat terpenuhi yakni $>10^5$ cfu/mL.

HASIL

Pertumbuhan Pada Medium Pengayaan

Pertumbuhan jumlah *V.cholerae* O1 pada medium pengayaan dapat diamati dengan melihat tingkat konsentrasi kekeruhan, semakin keruh suspensi yang terbentuk menunjukkan tingkat pertumbuhan bakteri. Tabel 1 menunjukkan pengukuran konsentrasi kekeruhan bakteri pada tiap medium yang diukur pada awal sebelum inkubasi 37°C, kemudian diukur lagi setelah inkubasi 37° C pada jam ke 2, jam ke 4, jam ke 6 dan jam ke 8. Pada masing – masing medium (M1: Bismuth sulfite , M2 : Gelatine Phosphate Salt Broth, M3: Air Peptone Alkali) terlihat peningkatan bakteri yang ditandai dengan meningkatnya konsentrasi

kekeruhan bakteri setiap 2 jam pengukuran. Dari Tabel 1 terlihat medium air peptone alkali (M3) lebih cepat meningkatkan pertumbuhan bakteri dibandingkan dengan medium bismuth sulfite (M1) dan medium gelatin phosphate salt broth .

Pengujian *V.Cholera* O1 dengan Rapid Immunokromatografi Strip Test

Pada Tabel 2 ditunjukkan hasil pemeriksaan rapid immunochromatographic strip test. pada medium air peptone alkali (M3) menunjukkan hasil *V.cholerae* O1 lebih banyak terdeteksi positif yakni sebanyak 17 test, diikuti oleh medium gelatine phosphate salt broth (M2) sebanyak 13 test dan medium bismuth sulfite (M1) sebanyak 8 test..

Tabel.1. Pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 menggunakan nefelometer pada medium pengayaan Bismuth Sulfite (M1), Gelatin Phosphate Salt Broth (M2) Air Peptone Alkali (M3)

Jml Awal (cfu/m L)	K.Awal (MacFarlan d)	M1				M2				M3			
		JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA
		M ke 2	M ke 4	M ke 6	M ke 8	M ke 2	M ke 4	M ke 6	M ke 8	M ke 2	M ke 4	M ke 6	M ke 8
10 ⁶	0.02	0.0	0.1	0.2	0.4	0.0	0.1	0.3	0.4	0.1	0.6	0.9	1.0
		4	2	3	1	9	8	3	6	6	7	4	8
10 ⁵	0.01	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0	0.1	0.2	0.3	0.0	0.4	0.7	1.0
		2	7	5	5	5	1	3	8	8	6	8	1
10 ⁴	0.00	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0	0.1	0.6	0.9
		1	4	2	5	3	8	9	1	5	9	0	3
10 ³	0.00	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0	0.1	0.5	0.8
		0	2	0	8	1	6	6	0	2	2	0	5
10 ²	0.00	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.7
		0	1	8	6	0	4	7	5	0	5	3	0
10 ¹	0.00	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.6
		0	1	6	0	0	2	5	0	0	2	7	0

Keterangan :

Jumlah Awal: jumlah bakteri *V.cholerae* O1 sesuai pengenceran yang dibuat dari 10⁶ - 10¹ cfu/mL.

Konsentrasi Awal: konsentrasi kekeruhan awal bakteri yang diukur dengan nefelometer sebelum diinkubasi pada jam ke 2, jam ke 4 , jam ke 6 dan jam ke 8

Tabel 2 : Hasil Pengujian *V.cholerae* pada medium pengayaan Bismuth Sulfite (M1) Gelatin Phosphate Salth Broth (M2), Air Peptone Alkali (M3) dengan Rapid Immunokromatografi Strip Test

Jml Awal (cfu/mL)	M1				M2				M3			
	JA M ke 2	JA M ke 4	JA M ke 6	JA M ke 8	JA M ke 2	JA M ke 4	JA M ke 6	JA M ke 8	JA M ke 2	JA M ke 4	JA M ke 6	JA M ke 8
10^6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^5	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
10^4	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
10^3	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
10^2	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
10^1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Keterangan :

Jml Awal : jumlah bakteri *V.cholerae* O1 yang diinokulasikan ke tiga medium pengayaan.(+) : positif *V.cholerae* O1 hasil deteksi dengan menggunakan Rapid Immunokromatografi(-) : negatif *V.cholerae* O1 hasil deteksi dengan menggunakan Rapid Immunokromatografi

Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan medium air peptone alkali (M3) sebagai medium pengayaan memberikan pertumbuhan yang lebih optimum bagi *V.cholerae* O1 dan dapat dideteksi dengan immunochromatographic strip test lebih cepat dibandingkan dengan medium lainnya

PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan medium air peptone alkali (M3) lebih cepat meningkatkan pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 dibandingkan dengan medium lainnya. Peningkatan ini terjadi karena bakteri *V.cholerae* O1 pada medium pengayaan terus berkembang memperbanyak diri dengan cara membelah pada kondisi nutrisi makanan yang melimpah, adanya garam – garam mineral , pH alkali dan suhu yang cocok. ⁽⁷⁾ Pada ketiga medium pengayaan tersebut juga terdapat tingkat konsentrasi pertumbuhan yang berbeda

antara M1,M2 dan M3. Secara deskriptif menunjukkan nilai rata – rata pertumbuhan pada M3 , M2 dan M1 berbeda relatif jauh. Pada M3 rata – ratanya 0,43 dan pada M2 0,14, sedangkan pada M1 0,10. Pada uji beda rata – rata nilai *p.value* adalah 0,000 artinya ada satu di antara ketiga medium pengayaan yang memberikan pertumbuhan bakteri *V.cholerae* yang berbeda. Hasil ini menunjukkan M3 dapat meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae* O1 lebih baik dibandingkan M1 atau M2. Semakin cocok kondisi kandungan nutrisi medium pengayaan bagi pertumbuhan *V.cholerae* O1, maka semakin tinggi tingkat pertumbuhan sel bakteri, sehingga dapat dikatakan medium air peptone alkali lebih baik dibandingkan dengan yang lainnya. Hal ini dikarenakan hasil metabolisme peptone oleh bakteri *V.cholerae* O1 tidak menghasilkan asam yang merugikan bakteri, selain itu pH alkali dan kandungan garamnya sangat cocok bagi pertumbuhan bakteri *V.cholerae* ^(7, 11, 12)

Pada kondisi kandungan nutrisi medium yang terbatas atau tidak cocok maka pertumbuhan bakteri akan melambat. Lambatnya pertumbuhan bakteri ini sebagai upaya untuk efisiensi terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan.⁽¹¹⁾ Hal ini tercermin dari perbedaan konsentrasi kekeruhan tiap 2 jam pengukuran pada masing – masing medium.

Penelitian dalam meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae* O1 merekomendasikan pemakaian air peptone alkali dan gelatine phosphate salt broth sebagai medium pengayaan untuk meningkatkan pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1, namun tidak menjelaskan efisiensi pemakaian medium tersebut.⁽⁵⁾ Penelitian lain juga merekomendasikan penggunaan medium bismuth sulfite sebagai medium pengayaan untuk *V.cholerae* di-karenakan selain alkali, medium bismuth sulfite dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* dan bakteri lainnya. Adanya natrium sulfite di dalamnya dapat mempertahankan pH medium tetap alkali.⁽⁶⁾ Namun dalam penelitian ini menunjukkan tingkat efisiensi penggunaan medium air peptone alkali dalam meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae* O1 lebih baik dibandingkan medium pengayaan lainnya.

Pada pengujian lebih lanjut selain dilakukan pengukuran konsentrasi kekeruhan bakteri *V.cholerae* O1, tiap sampel pengenceran juga dilakukan pemeriksaan rapid immunokromatografi strip test setiap 2 jam pada jam ke 2, 4, 6, dan 8, untuk memastikan bakteri tersebut adalah *V.cholerae* O1, sehingga total pengujian berjumlah 24 untuk masing – masing medium pengayaan. Dari data tersebut terlihat bahwa bakteri yang diinokulasikan ke medium pengayaan air peptone alkali menunjukkan hasil positif immunochromatographic strip test lebih banyak dibandingkan pada medium pengayaan lainnya yakni bismuth sulfite dan gelatin phosphate salt broth. Peningkatan jumlah

bakteri *V.cholerae* O1 dapat terdeteksi dengan rapid immunokromatografi test ini apabila jumlahnya telah mencapai minimum 10^5 cfu/mL.^(8, 13, 14) Pada tiap waktu inkubasi setiap 2 jam juga terlihat bahwa medium air peptone alkali lebih baik dibandingkan kedua medium lainnya. Pada penelitian dalam mengevaluasi metode rapid immunokromatografi strip test ini menyebutkan bahwa penggunaan medium pengayaan air peptone alkali akan meningkatkan sensitifitas uji rapid test sebesar 94 % – 100 % setelah spesimen feses diinokulasikan ke medium pengayaan dan diinkubasi 37 ° C selama 24 jam.^(8, 10, 13, 14)

Apabila spesimen berupa faeses yang cair *V.cholerae* dapat langsung dideteksi dengan sensitifitas 10^5 CFU/mL, namun sampel berupa *tipped-cotton swab V.cholerae* dapat dideteksi dengan 10 CFU/mL, akan tetapi harus dilakukan perbanyakan bakteri terlebih dahulu dengan menggunakan medium air pepton alkali dan diinkubasi selama 6 - 8 jam. Test ini dilakukan dengan cara mencelupkan strip tes ke wadah yang berisi spesimen, kemudian interpretasi hasil dapat dilakukan selama 15 -20 menit. Hasil dengan terbentuknya 2 pita orange menunjukkan hasil positif *V.cholerae* dan bila terbentuk satu pita menunjukkan hasil yang negatif.^(8, 10, 13, 14)

Pada penelitian lain juga menyebutkan konsentrasi jumlah sel bakteri *Vibrio cholerae* dapat ditingkatkan dengan menggunakan medium pengayaan seperti air peptone alkali dan gelatine phosphate salt broth yang diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 6 – 8 jam sebelum dilakukan isolasi pada medium thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS), namun penelitian tersebut tidak menyebutkan efisiensi pemakaian medium pengayaan tersebut dalam membantu pengujian rapid immunokromatografi strip test.⁽⁵⁾

Medium pengayaan juga sangat berguna untuk sampel yang diduga jumlah

sel bakteri *cholerae* sangat sedikit terutama pada penderita kolera yang tidak tampak gejala - gejalanya. Selain itu juga medium pengayaan digunakan sebagai medium transport dan sebagai perlakuan awal identifikasi feses pasien yang diduga kolera, namun pada pasien yang terkena diare kolera akut, penggunaan medium pengayaan tidak disarankan karena sudah pasti dapat dideteksi dengan cepat.⁽¹⁰⁾

KESIMPULAN

Medium pengayaan air peptone alkali lebih cepat meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae* O1 dibandingkan medium gelatine phosphate salt broth dan medium bismuth sulfite. Oleh karena medium air peptone alkali lebih cepat meningkatkan pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1, maka dengan menggunakan rapid immunochromatographic strip test dapat dengan cepat pula terdeteksi positif adanya *V.cholerae* O1. Waktu inkubasi yang diperlukan untuk memperbanyak jumlah *V.cholerae* O1 pada medium air peptone alkali juga lebih cepat dibandingkan medium gelatine phosphate dan bismuth sulfite.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Drs.Ondri Dwi Sampurno, Apt,MSc. selaku kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Soemarsono H. Kolera: dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.1996. p. 443.
2. Pelczar J.M . Dasar – Dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia. Jakarta; 2005.

3. Wang XY, Ansaruzzaman M, Raul Vaz, Mondlane C, Lucas M, Seidlen Lorenz et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population. 2006; 6(17).
4. Simanjuntak CH, Larasati W, Arjoso S, Putri M, Lesmana M, A Buhari et al. Cholera in Indonesia in 1993 - 1999 .2001; 65(6): 788–97.
5. Depaola Angelo, A Charles, Kaysner, Merrill L.Elevated Temperature Method for Recovery of *Vibrio cholerae* from Oysters (*Crassostrea gigas*). 1997 May; 53(5): 1181 – 2.
6. Wilson James, Reilly L V, Bismuth Sulphite Media for The Isolation of *V.cholerae*, Public Health Laboratories, Queen's University, Belfast; 1960.
7. Lesmana M. *Vibrio & Campylobacter*. Universitas Trisakti. Jakarta. 2003.p .4 – 23.
8. Rohani MY, Hasnidah D, Ong KH. Evaluation of the Cholera Spot Test: a chromatographic immunoassay for the rapid detection of Cholera antigen . 1998; 20(1): 31 – 3.
9. Pronadisa, Microbiology Culture Media Manual, wwwcondalab.com.
10. Julie R. Harris, Elizabeth C C, Aglae A, Jean C B, Cherryl B, Parson B Michele et all. Field evaluation of Crystay VC_ Rapid Dipstick test for cholera during a cholera outbreak in Guinea-Bissau.2009 Sept;14(9): 1117– 21.
11. Meiyanti, Oktavianus CH, Julius E, Lesmana M. Alkaline Pepton Water Plus 0,5 % agar Suitable for Transfort of *Vibrio cholerae*. Universa Medicina: , Agustus 2011.
12. Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. Clinical Microbiology Reviews. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8(1):48.
13. Nato F, Boutonnier A, Rajerison, Grosjean P, Dartevelle S, Guenole A, et al. One – Step Immunochromatographic Dipstick Tests For Rapid Detection. 2003 May: 10(3): 476-8.
14. Immunochromatographic one step Rapid visual test for *Vibrio cholerae*. Crstal VC. Span Diagnostics Ltd; 2011.