

Diagnosa *Vibrio Cholerae* dengan Metode Kultur dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Sampel Sumber Air Minum

Kharirie

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI
email: khariri@litbang.depkes.go.id

Abstract

*Cholera remains a serious health problem in developing countries such as Indonesia. This is caused by several things such as hygiene and sanitation, as well as drinking water supply is not adequate. *Vibrio cholerae* is commonly found in surface water contaminated with feces containing the bacteria. Diagnosis of *V. cholerae* can be done in several ways such as by conventional methods and a polymerase chain reaction (PCR). The study aimed to compare the conventional method diagnoses *V. cholerae* by PCR. Examination of samples derived from the source of drinking water collected from cholera outbreaks in Bogor. The study was conducted at the Laboratory of Bacteriology Center for Biomedical and Health Technology Association. Examination of *V. cholerae* by conventional methods require a cheaper cost, but the time required to process a longer inspection. On examination with the required time PCR methods for the examination more quickly, but the costs are much higher.*

Key words: *Vibrio cholerae* ,The conventional methods, PCR

Abstrak

Diare kolera masih menjadi masalah kesehatan yang serius di negara berkembang seperti Indonesia. Hal ini disebabkan oleh beberapa hal seperti higiene dan sanitasi yang tidak baik, serta penyediaan air minum yang belum memadai. *Vibrio cholerae* banyak ditemui pada permukaan air yang terkontaminasi dengan tinja yang mengandung bakteri tersebut. Diagnosa *V. cholerae* dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya dengan metode konvensional dan *polymerase chain reaction* (PCR). Penelitian bertujuan untuk membandingkan diagnosa *V. cholerae* metode konvensional dengan metode PCR. Sampel pemeriksaan berasal dari sumber air minum yang dikumpulkan dari kejadian luar biasa (KLB) kolera di Bogor. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Pemeriksaan *V. cholerae* dengan metode konvensional memerlukan biaya yang lebih murah, namun waktu yang diperlukan untuk proses pemeriksaan lebih lama. Pada pemeriksaan dengan metode PCR waktu yang diperlukan untuk pemeriksaan lebih cepat, namun memerlukan biaya yang jauh lebih tinggi

Kata Kunci : *Vibrio cholerae*, metode konvensional, PCR

Pendahuluan

Diare kolera masih menjadi masalah kesehatan yang cukup serius di banyak negara berkembang seperti Indonesia. Hal ini disebabkan belum baiknya higiene, sanitasi serta penyediaan air minum. Diare merupakan buang air besar dengan konsistensi encer atau cair dan frekuensinya lebih dari tiga kali dalam satu hari. Diare dapat dibedakan menjadi diare akut dan kronis. Diare akut karena infeksi dapat disebabkan oleh infeksi bakteri, virus atau parasit. Salah satu bakteri yang menyebabkan diare adalah *Vibrio cholerae* dan biasanya diare yang ditimbulkan disebut dengan diare kolera. Diare kolera disebabkan oleh enterotoksin yang dihasilkan bakteri *V. cholerae* dan membentuk koloni di dalam usus kecil. Gejala yang ditimbulkan meliputi muntah, buang air besar seperti air beras dalam jumlah banyak yang mengakibatkan dehidrasi, kehilangan elektrolit dan naiknya keasaman darah. Pada kasus yang berat, penderita terus menerus buang air besar disertai muntah, sehingga penderita akan kehilangan cairan serta elektrolit dengan cepat dari saluran pencernaan. Hal ini menyebabkan renjatan keasaman metabolik dan bila tidak diobati dapat menyebabkan kematian.^{1,2}

Mekanisme patogen *V. cholerae* disebabkan karena meningkatnya sekresi enterotoksin yang merangsang aktivitas enzim adenil siklase di dalam sel usus. Hal ini mengakibatkan perubahan adenosin tri pospat (ATP) menjadi adenosin mono pospat siklik (cAMP) yang menyebabkan sekresi elektrolit kedalam rongga usus sehingga mengakibatkan hilangnya cairan dalam jumlah besar dan ketidak seimbangan elektrolit.³ Infeksi bakteri ini dapat mengakibatkan gastroenteritis yang ditandai dengan buang air besar berdarah disertai muntah berdarah, demam dan sakit kepala. Bakteri *V. cholerae* tidak bersifat invasif, tidak masuk ke dalam aliran darah tetapi tetap berada di saluran usus.⁴ Pada saat terjadi infeksi melalui makanan dan minuman terkontaminasi yang tertelan,

maka setelah melewati pertahanan asam lambung *V. cholerae* menghasilkan dua faktor virulensi yang menyebabkan kolera yaitu *toxin coregulated pilus* (TCP) dan *cholera toxin* (CT). TCP berperan dalam proses kolonisasi pada intestinal sedangkan CT menyebabkan seseorang mendapatkan gejala yang khas pada diare kolera. Gen cholera enterotoksin hanya dimiliki *V. cholerae* patogen yaitu O1 dan O139.^{5,6,7}

Vibrio cholerae merupakan bakteri yang berbentuk batang bengkok seperti koma berukuran (0,5 μm x 1,5 – 3,0 μm), gram negatif, tidak berspora, hidup secara aerob atau anaerob fakultatif, bergerak melalui flagel yang monotrik, tidak membentuk spora, dan pada biakan tua dapat menjadi berbentuk batang lurus. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah pada suhu 18-37°C.⁷ Bakteri ini dapat tumbuh pada berbagai jenis media, termasuk media tertentu yang mengandung garam mineral dan asparagin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Pertumbuhan yang baik terjadi pada agar *thio sulfat citrate bile sucrose* (TCBS), yang menghasilkan koloni berwarna kuning.⁹ Morfologi dan sifat-sifat *V. cholerae* ini dapat dijadikan pedoman dalam diagnosa atau identifikasi *V. cholerae* secara konvensional. Keberadaan cholera enterotoksin yang spesifik hanya terdapat pada *V. cholerae* patogen dapat menjadi target dalam pemeriksaan laboratorium untuk diagnosa bakteri *V. cholerae* patogen dengan menggunakan teknik biomolekuler seperti metode *polymerase chain reaction* (PCR).^{10,11}

Metode

Sampel

Sampel yang digunakan untuk pemeriksaan berasal dari air yang biasa digunakan untuk kebutuhan sehari-hari masyarakat setempat. Tempat pengambilan sampel merupakan tempat dilaporkannya kejadian diare kolera yaitu di Kecamatan Cisarua Kabupaten Bogor.

Sampel air yang dikumpulkan berasal dari air sungai, air sumur dan tempat penampungan air (tempayan).

Identifikasi Secara Konvensional

Sampel dari swab rektal ditanam terlebih dahulu pada medium perbenihan alkaline peptone water (APW) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil dari media perbenihan APW kemudian dilakukan subkultur ke medium

thiosulfate-citrate-bile-sucrose (TCBS) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Apabila terjadi pertumbuhan koloni pada medium agar TCBS selanjutnya dilakukan uji biokimia dan serologi dengan menggunakan antiserum polivalen dan monovalen *V. cholerae*. Uji biokimia untuk identifikasi *V. cholerae* dapat dilakukan dengan melakukan serangkaian uji pada medium seperti tampak pada Tabel 1.

Tabel 1. Reaksi Uji Biokimia *V. Cholerae*

Reaksi biokimia	Hasil reaksi
Oksidase	+
Pertumbuhan tanpa penambahan NaCl	+
KIA (Kligler Iron Agar)	Alkali / Asam
MIO (Motility Indole Ornithine)	+++
SSS (Sucrose Semi Solid)	+
Lysine	+
Arginine	-
Ornithine	+
Maltose	+
Arabinose	-

Uji serologi dilakukan untuk konfirmasi koloni *V. cholerae* dilakukan dengan reaksi aglutinasi antigen somatik (antigen O). Antiserum spesifik *V. cholera* terdiri dari antiserum polivalen, monovalen ogawa dan monovalen inaba. Uji serologi dilakukan dengan meneteskan satu tetes antiserum polivalen *V. cholerae* pada sediaan gelas obyek steril dan ditambahkan dengan salah satu suspensi koloni bakteri yang diduga bakteri *V. cholerae*. Penambahan suspensi koloni bakteri dilakukan dengan cara mengoleskan satu ose koloni bakteri tersebut mulai dari pinggir tetesan

antiserum polivalen *V. cholerae*, kemudian diaduk sambil sediaan gelas obyek digoyang-goyangkan dan dilihat adanya reaksi aglutinasi. Terbentuknya aglutinasi ditandai dengan pembentukan endapan berupa pasir halus. Apabila terbentuk aglutinasi maka hal ini menunjukkan bahwa reaksi positif dan koloni bakteri tersebut dapat dinyatakan sebagai bakteri *V. cholerae* patogen. Apabila akan ditentukan serotipenya, tahapan selanjutnya dapat dilakukan uji aglutinasi dengan menggunakan antiserum monovalen *V. cholerae* yang terdiri dari antiserum Inaba dan Ogawa. Interpretasi

hasil uji serologi dengan antiserum monovalen *V. cholerae* dapat dilihat pada Tabel 2. Dibawah ini yang menunjukkan

interpretasi hasil uji serologi dengan antiserum

Tabel 2. Interpretasi Hasil Uji Serologi Dengan Antiserum *V. cholerae*

Serotipe <i>V. cholerae</i> O1	Aglutinasi	
	Antiserum Ogawa	Antiserum Inaba
Ogawa	+	-
Inaba	-	+
Hikojima	+	+

Identifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Ekstraksi DNA *V. Cholerae*

Ekstraksi DNA dilakukan dengan *Qiagen Extraction kit*. Terlebih dahulu heat block dipanaskan sampai mencapai suhu 56°C. Sampel swab rektal dibuat suspensi sampai 200 µL dalam PBS. Masukkan 20 µL Protease K ditambah dengan 200 µL sampel dan 200 µL Buffer AL ke dalam 1,5 mL microcentrifuge tube, kemudian vortex selama 15 detik. Campuran diinkubasi di heat block pada suhu 56°C selama 30 menit untuk melisis sel dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 95°C selama 15 menit. Tabung microcentrifuge 1,5 ml dilakukan spin down untuk menghapus tetes dari dalam tutup. Sebanyak 200 µl ethanol absolut ditambahkan ke dalam sampel kemudian vortex selama 15 detik. Setelah itu disentrifuge dengan tabung microcentrifuge 1,5 ml untuk menghapus tetes dari bagian dalam tutupnya. Kemudian dengan hati-hati masukkan ke dalam kolom spin mini tanpa membasahi rim, tutup dan disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Buang supernatan dan ganti *collection tube*. Selanjutnya dengan hati-hati buka kolom spin mini dan tambahkan 500 µl Buffer AW1 tanpa membasahi rim dan

disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Buang supernatan dan ganti collection tube. Secara hati-hati buka kolom spin mini dan tambahkan 500 µl buffer AW2 tanpa membasahi rim dan disentrifuge dengan kecepatan tinggi 14.000 rpm selama 3 menit. Kolom spin mini ditempatkan dalam tabung 1,5 ml microcentrifuge bersih, dan membuang tabung berisi koleksi filtrat. Buka kolom spin mini dan ditambahkan 150 µl Buffer AE atau air suling. Inkubasi pada suhu kamar (15-25°C) selama 1 menit, dan kemudian disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Buang spin column dan sampel DNA siap digunakan untuk PCR.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) dilakukan dengan menggunakan kit Invitrogen. Primer diencerkan sesuai dengan instruksi yang ada pada kemasan primer dalam tube master. Perbandingan pengenceran antara primer dengan nuklease free water yaitu 10 : 90. Sepuluh bagian primer dari tube master dimasukkan ke dalam tube steril, kemudian ditambahkan 90 bagian nuklease free water. PCR mix yang terdiri dari 10x PCR amplification buffer (5 µL), 5 mM MgSO₄ (1,5 µL), 10 mM dNTP mixture (1 µL), Primer forward (1 µL), Primer reverse (1 µL), PCR grade water (36 µL), Taq

polymerase (0,5 μL), dibuat dalam satu tube dan sesuai kebutuhan. Kontrol negatif dibuat dengan menambahkan air steril sejumlah 4 μL ke dalam 46 μL PCR mix. Tambahkan DNA template sebanyak 4 μL ke dalam masing-masing PCR tube yang telah di aliquot sehingga akan memberikan volume akhir masing-masing 50 μL . Kontrol positif dibuat dengan menambahkan kultur DNA kontrol sejumlah 4 μL ke dalam 46 μL PCR mix. Tube yang telah berisi mix dan DNA template dimasukkan ke dalam mesin PCR. Mesin PCR diprogram dengan tahapan predenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing (pengikatan) pada 55°C selama 1 Menit, extension (pemanjangan) pada suhu 72°C selama 1 Menit, dan elongation (pemanjangan akhir) pada suhu 72°C selama 7 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus.

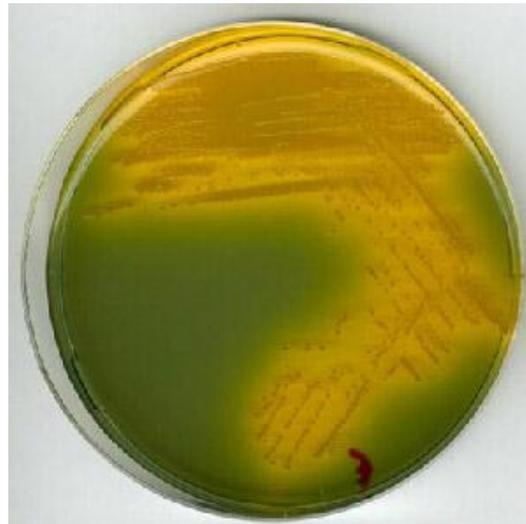
Elektroforesis

Gel agarosa 2% dibuat terlebih dahulu dan selanjutnya disiapkan pada alat elektroforesis. Sampel sebanyak 9 μL yang sudah dicampur homogen dengan blue juice 1 μL dimasukkan ke dalam sumuran (well). Loading dye sebanyak 10 μL dimasukkan ke dalam sumuran sebagai marker. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 45 menit. Setelah selesai gel kemudian diletakkan di dalam alat pengamat DNA (*Gel Doc*) dan diamati dibawah lampu UV. Pada foto dapat dilihat pola pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran pita-pita standar "1 kb DNA ladder", dimana ukuran pola pita gen *ctx Vibrio cholerae* sesuai yang ditargetkan.

Hasil

Sampel yang telah diinokulasikan pada media agar TCBS yang diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, pada hari berikutnya kemudian diamati pertumbuhan koloni yang ada. Pada agar TCBS

menunjukkan pertumbuhan koloni yang memiliki morfologi yang besar dengan diameter 2-3 mm, permukaan yang halus, agak datar, bagian tengah buram dan bagian pinggir terang, berwarna kuning (meragi sukrosa). Morfologi tersebut merupakan bentuk koloni dari bakteri *V. cholerae*. Pertumbuhan bakteri *V. cholerae* pada medium agar TCBS dapat dilihat contohnya seperti yang tampak pada Gambar 1.

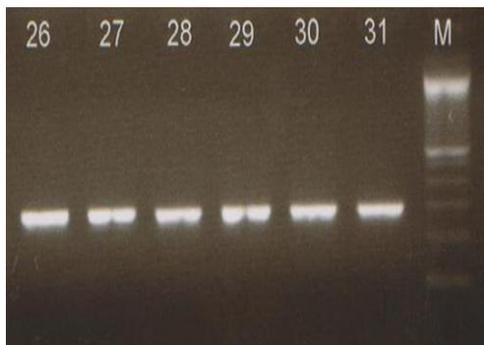


Gambar 1. Pertumbuhan *V. Cholerae* pada Medium Agar TCBS

Hasil uji aglutinasi dengan antiserum polivalen *V. cholerae* menunjukkan hasil positif pada semua koloni, sehingga dapat dinyatakan bahwa seluruh sampel merupakan bakteri *V. cholerae* serogroup O1. Semua sampel juga menunjukkan hasil positif pada uji aglutinasi dengan menggunakan antiserum monovalen *V. cholerae* Ogawa, sehingga dapat dinyatakan bahwa bakteri tersebut merupakan *V. cholerae* O1 serotipe Ogawa.

Hasil amplifikasi produk PCR sepanjang sekitar 300-400 basa kemudian dilihat dengan menggunakan elektroforesis dan dilihat dengan pencahayaan ultraviolet. Penanda (marka) yang merupakan campuran molekul dengan

ukuran berbeda-beda yang dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel dengan melakukan elektroforesis marka tersebut pada lajur di gel yang paralel dengan sampel. Pita pada lajur sampel tersebut dapat dibandingkan dengan pita marka untuk mengetahui jumlah pasang basa DNA yang terdeteksi dan terisolasi dari sampel. Panjang pita yang diharapkan disini adalah 302 bp untuk gen *ctx V. cholerae* sedangkan pada hasil yang negatif tidak akan terbentuk pita. Pada pembacaan elektroforesis dengan pencahayaan ultraviolet didapatkan pita yang terbentuk dari semua lajur sampel dan kemudian dicocokkan dengan penanda menunjukkan semua lajur sampel menghasilkan pita sepanjang 302 bp seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2. Hal ini menunjukkan bahwa semua sampel positif gen *ctx V. cholera*.



Gambar 2. Hasil elektroforesis amplifikasi gen *ctx* dengan Gel Agarosa 2% (M: marker, 31: Kontrol Positif, 26-30: Sampel Air)

Pembahasan

Metode untuk diagnosa bakteri dapat dilakukan secara konvensional seperti pemeriksaan mikroskopik, kultur (biakan), dan serologi. Namun, metode tersebut masih mempunyai banyak kelemahan. Metode pemeriksaan dengan menggunakan mikroskopik memerlukan jumlah bakteri minimal 10.000 sel/ml dan

tidak dapat mendeteksi spesies mikobakteria.¹² Identifikasi *V. cholerae* secara konvensional dengan kultur dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara langsung dengan menanam bahan pemeriksaan (swab rektal, tinja, muntahan) pada lempeng agar *thiosulfat citrate bile salts sucrose* (TCBS), dan secara tidak langsung yaitu bahan ditanam terlebih dahulu pada media perbenihan alkaline peptone water (APW) dan diinkubasi selama 18 – 20 jam pada suhu 37°C. Dari media perbenihan APW selanjutnya dapat dilakukan subkultur ke media TCBS. Identifikasi yang dilakukan secara konvensional didasarkan pada morfologi dan sifat-sifat bakteri *V. cholerae*.^{13,14}

Metode konvensional dengan medium kultur merupakan baku emas dalam mendiagnosa penyakit diare yang disebabkan oleh infeksi bakteri *V. cholerae*. Pemeriksaan dengan medium kultur mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi, akan tetapi proses pemeriksaan memerlukan waktu yang cukup lama.¹² Sensitivitas metode tersebut mendekati 100% dan pemeriksaan dapat dilakukan terhadap sampel klinis yang mempunyai kandungan bakteri 10-100 sel. Meskipun metode kultur merupakan metode baku, namun metode konvensional memiliki kekurangan karena untuk identifikasinya memerlukan waktu yang lebih lama yaitu 2–3 hari. Metode konvensional juga harus dilakukan oleh tenaga laboratorium yang sudah terlatih dan hal lain yang menjadi kendala adalah umumnya tidak tersedianya fasilitas laboratorium mikrobiologi pada kasus kejadian luar biasa kolera.^{14,15}

Hasil uji serologi dengan menggunakan antiserum polivalen dan monovalen *V. cholerae* menunjukkan bahwa bakteri yang berhasil diisolasi merupakan bakteri *V. cholerae* serogrup O1 serotipe Ogawa. Bakteri *V. cholerae* dibedakan menjadi beberapa serogroup berdasarkan antigen O-nya. Meskipun terdapat lebih dari 200 macam serogroup,

namun hanya terdapat dua serogroup yang dianggap sangat patogen dan menjadi penyebab kejadian wabah kolera di dunia yaitu serogroup O1 dan O139. Bakteri *Vibrio cholerae* serogroup O1 dan O139 yang merupakan bakteri yang menyebabkan kolera epidemik dan pandemik, serta *Vibrio cholerae* serogroup non O1 dan non O139 yang menyebabkan diare yang mirip kolera, namun gejala yang ditimbulkan masih ringan dan jarang ditemui infeksi ekstraintestinal. Pada umumnya *V. cholerae* yang diisolasi di Indonesia merupakan serogroup O1 dan serotipe Ogawa.^{16,17,18}

Berbagai penelitian untuk mengembangkan metode diagnosa terus dilakukan. Salah satu teknik yang telah dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan metode diagnosa konvensional adalah metode pemeriksaan berdasarkan pada amplifikasi DNA menggunakan metode PCR. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu metode yang digunakan untuk amplifikasi urutan basa DNA tertentu (selektif). Metode ini pertama kali ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1987. Metode PCR dapat digunakan untuk menggandakan urutan basa nukleotida tertentu secara *in vitro*. Penggandaan urutan bas nukleotida berlangsung melalui reaksi polimerisasi yang dilakukan berulang-ulang secara berantai selama beberapa putaran (siklus). setiap reaksi polimerisasi membutuhkan komponen-komponen sintesis DNA seperti untai DNA yang akan digunakan sebagai cetakan (*template*), molekul oligonukleotida untai tunggal dengan ujung 3'-OH bebas yang berfungsi sebagai prekursor (primer), sumber basa nukleotida berupa empat macam dNTP tahap selanjutnya, masing-masing untai tunggal (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dan enzim DNA polimerase.¹⁹ Pemeriksaan *V. cholerae* dengan menggunakan metode PCR dan kemudian dikonfirmasi dengan gel elektroforesis berhasil mendapatkan

bahwa sampel tersebut merupakan mengandung bakteri *V. cholerae* patogen karena positif mengandung gen *ctx*. Gen *ctx* merupakan gen yang terdapat pada bakteri *V. cholerae* patogen yang menghasilkan toksin kolera (*cholera toxin* = CT). Toksin kolera sangat berperan dalam menyebabkan terjadinya diare. Gen *ctx* ini hanya dimiliki oleh *V. cholerae* patogen sehingga untuk mengidentifikasi bakteri ini hanya dapat dilakukan dengan melihat gen spesifik yang dimilikinya. Gen spesifik tersebut dapat dilihat dengan pemeriksaan menggunakan metode PCR. Tidak semua bakteri *V. cholerae* mempunyai gen *ctx* dan hanya bakteri *V. cholerae* patogen yang mempunyai gen ini yaitu *V. cholerae* serogroup O1 dan O139.²⁰

Kelebihan pemeriksaan laboratorium untuk diagnosa *V. cholerae* dengan menggunakan metode PCR adalah pada kecepatan waktu yang diperlukan untuk proses pemeriksaan. Selain itu, metode tersebut merupakan metode yang sensitif dan spesifik apabila dibandingkan dengan metode pembiakan yang merupakan metode baku emas (*gold standard*) pada identifikasi bakteri. Identifikasi dengan menggunakan metode PCR, sampel yang kita periksa atau identifikasi bakteri penyebab infeksi dapat diketahui hasilnya dalam waktu satu hari. Hal ini sangat berbeda sekali dengan metode pemeriksaan secara konvensional yang harus membutuhkan waktu yang lebih dari satu hari untuk dapat mengetahui hasilnya. Apabila dibandingkan dengan metode konvensional, metode PCR memerlukan biaya dan peralatan yang cukup mahal.^{20,21}

Kesimpulan

Pemeriksaan laboratorium untuk diagnosa bakteri *V. cholerae* dapat dilakukan dengan metode konvensional dan PCR. Hasil pemeriksaan dengan kedua metode tersebut dapat diidentifikasi bahwa sampel air tersebut mengandung bakteri *V.*

cholerae patogen serogroup O1. Diagnosa *V. cholerae* dengan metode konvensional memerlukan biaya yang lebih murah, namun waktu yang diperlukan untuk proses pemeriksaan lebih lama. Pada pemeriksaan dengan metode PCR waktu yang diperlukan untuk pemeriksaan lebih cepat, namun memerlukan biaya yang jauh lebih tinggi.

Saran

Diagnosa bakteri *V. Cholerae* dengan menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode alternatif, namun metode konvensional dengan kultur isolasi bakteri yang merupakan metode baku dalam diagnosa bakteri perlu juga dilakukan dalam prosedur pemeriksaan laboratorium.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kami sampaikan kepada Dinas Kesehatan Kabupaten Bogor atas kerjasamanya dalam pengambilan sampel untuk dilakukan pemeriksaan.

Daftar Rujukan

- Soemarsono H. Kolera: dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 1996. p. 443.
- Pelczar J.M. Dasar – Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Universitas Indonesia, 2005.
- Ganguly NK, Kaur T. Mechanism of action of cholera toxin & other toxins. *Indian J Med Res.* 1996; 104(1): 28-37.
- Lindmark Barbro. Modulators of *Vibrio cholerae* Predator iInteraction and Virulence. Sweden: Department of Molecular Biology Umea University; 2009.
- Chaudhuri K, Chatterjee SN. Cholerae Toxin. Germany: Springer; 2009.
- Walia K, Ghosh S, Singh H, Nair GB, Ghosh A et al. Purification and characterization of novel toxin produced by *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun.* 1999; 67(10): 5215–22.
- Matson JS, Withey JH, DiRita VJ. Regulatory Networks Controlling *Vibrio cholerae* Virulence Gene Expression. *Infection and Immunity.* 2007; 75(12): 5542–49.
- Jawetz, Melnick, Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran. Buku Kedokteran EGC. Jakarta; 2005; 274 - 6.
- Lesmana M. *Vibrio & Campylobacter.* Jakarta: Universitas Trisakti. 2003; 4 – 23.
- Chomvarin C, Namwat W, Wongwajana S, Alam M, Thaew-Nonngiew K, Sinchaturus A, Engchanil C. Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2007; 53: 229–237.
- Marashi SMA, Rajabnia R, Fooladi AAI, Hojati Z, Moghim S, Esfahani BN. Determination of *ctxAB* Expression in *Vibrio cholerae* Classical and El Tor Strains using Real-Time PCR. *Int J Mol Cell Med.* 2013;2: 9-13.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, (ed). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company. 1990;.703-14.
- Sariadji K, Sunarno, Puspendari N, Wati M, Khariri, Sofiah SN, Amalia A. Evaluasi Medium Pengayaan *Vibrio cholerae* untuk Diagnosis Kolera Menggunakan Immunochromatographic Strip Test. *Bul. Penelit. Kesehat.* 2013; 41(1): 11 – 17.
- Priadi A dan Natalia L. Patogenesis Septicaemia Epizoqtica (Se) Pada Sapi/Kerbau: Gejala Klinis, Perubahan Patologis, Reisolasi, Deteksi Pasteurella Multocida dengan Media Kultur dan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner.* 2000; 5 (1): 65-71.
- Anonym. 2010. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae* Chapter 4. Centers for Disease Control and Prevention. (Diakses: 9 Februari 2014) Diunduh dari: URL:<http://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-Vibrio-Cholerae-chapter-4.pdf>. p16-26.
- Ryan KJ. *Vibrio, Campylobacter, and Helicobacter.* Dalam: Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology. Edisi ke-4. USA: McGraw-Hill, 2004; 373-378.
- Amelia S. *Vibrio Cholerae.* Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara Medan: In press; 2005.
- World Health Organization. Cholera: global surveillance summary, 2008. 2009; 84(31): 309-24.
- Sachse K, Nat R, Frey J. PCR detection of microbial pathogens. Humana Press; 2010.
- Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews.* *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48.
- Rosilawati ML, Sudarmono P, Ibrahim F. Sensitivitas metode PCR (*Polymerase chain reaction*)dalam mendekteksi isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis.* *J Kedokteran Trisakti.* 2002;.21(1).