

PENGARUH KONSENTRASI NATRIUM CHLORIDA PADA MEDIA ALKALINE PEPTONE WATER TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Vibrio cholerae*

Luh Putu Rinawati¹, I Nyoman Arsana², Ni Ketut Ayu Juliasih³

Abstract

Backgrounds: Diarrhea disease remains a global health problem, especially in developing countries with less hygiene sanitation. Diarrhea can be caused by *Vibrio cholerae*. Growth of *Vibrio cholerae* stimulated by the addition of 1% sodium chloride (NaCl), and still be able to grow on a medium containing 6% NaCl, because *Vibrio cholerae* is the halophilic bacteria. **Objective:** This study aims to determine the effect of different concentrations of NaCl on media APW on the growth of *Vibrio cholerae*. **Methods:** This research method used completely randomized design. The treatment in the form of NaCl concentrations which consist of several levels of concentration are: 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, and 5%. Treatment was repeated 3 times, so we get 18 units of study. Variables were observed, including: media turbidity absorbance APW, the number of colonies, the size of the colony, colony color, texture colonies, and consistency colony. **Results:** The results showed concentrations of APW 0% indicated absorbance value of turbidity were highest and that concentrations also indicated the most number of colonies *Vibrio cholerae*. While the concentration of APW 5% indicated the greatest size of colonies of *Vibrio cholerae*. Besides, addition of NaCl in APW media would caused different color in colonies of *Vibrio cholerae*, but there were no differences in –texture and state of bacteria. **Conclusions:** There is an significant effect of NaCl concentrations which added to APW media on the growth of *Vibrio cholerae*. **Recommended:** (1) to isolate / grow *Vibrio cholerae* from pure stock APW media can be used without the addition of NaCl (APW 0 %) , while for isolating *Vibrio cholerae* from samples /raw material needs to be added NaCl (APW 5 %) to inhibit undesirable bacterial growth, (2) and for the next research can proceed with reviewing several variables, such as incubation time and growth competition between *Vibrio cholerae* and others.

Key words: Natrium chloride (NaCl), medium APW (Alkaline Peptone Water), *Vibrio cholera*.

¹. Jurusan Analis Kesehatan-Poltekkes Denpasar

^{2,3} Fakultas Biologi-Universitas Hindu Indonesia

Korespodensi:

Luh Putu Rinawati, Jurusan Analis Kesehatan-Poltekkes Denpasar,
Jalan Sanitasi No. 1

Sidakarya, Denpasar-Bali 80224, Indonesia. Telp. +62-361-710 527,
Fax. +62-361-710 448.

E-mail: meditoryjournal@gmail.com

PENDAHULUAN

Penyakit diare masih menjadi masalah kesehatan dunia terutama di negara berkembang.¹ Diare didefinisikan sebagai bertambahnya defekasi (buang air besar) lebih dari biasanya atau lebih dari tiga kali sehari, disertai dengan perubahan konsisten tinja (menjadi cair) dengan atau tanpa darah. Dalam beberapa kasus, diare disebabkan oleh bakteri dan virus, selain itu ada beberapa faktor yang menyebabkan kasus diare, yaitu: faktor infeksi, malabsorpsi, makanan, dan fisiologis.² Bakteri *Vibrio cholerae* dapat menyebabkan suatu penyakit yang disebut penyakit kolera, yaitu suatu penyakit infeksi akut yang disebabkan oleh enterotoksin yang dihasilkan oleh *Vibrio cholerae* yang membentuk koloni di usus kecil. Gejala-gejalanya meliputi muntah, berak seperti air cucian beras dalam jumlah banyak yang mengakibatkan dehidrasi, kehilangan elektrolit, dan naiknya keasaman darah.³

Tahun 2000 diperkirakan 4 milyar kasus terjadi di dunia pada tahun 2000 dan 2,2 juta diantaranya meninggal. Besarnya masalah tersebut terlihat dari tingginya angka kesakitan dan kematian akibat diare.⁴ Di Indonesia, penyakit diare di Indonesia merupakan peringkat ke 13 dari 22 penyakit yang menyebabkan kematian pada semua kelompok umur. Dalam laporan ini juga disebutkan kecenderungan kasus penyakit diare yaitu pada tahun 2000-2010 terlihat kecenderungan kejadian naik.⁵

Bakteri *Vibrio cholerae* ditemukan pertama kali oleh ahli anatomi dari Italia bernama Filippo Pacini pada tahun 1854. Dalam *Bergey's Manual of Determination Bacteriology*, bakteri *Vibrio cholerae* termasuk dalam kingdom bacteria; filum proteobacteria; kelas gamma proteobacteria; ordo

vibrionales; family vibriaceae; genus *vibrio*; spesies *Vibrio cholerae*.⁶ *Vibrio cholerae* mempunyai sifat, antara lain anaerob-fakultatif, gram-negatif, non-spora berbentuk batang melengkung, dan panjang sekitar 1.4-2.6mm, mampu melakukan metabolisme pernafasan dan fermentasi terhadap media pertumbuhan, yang didefinisikan dengan baik atas dasar tes biokimia dan studi homologi DNA. Bakteri ini oksidase-positif, mengurangi nitrat, dan motil. Pertumbuhan *Vibrio cholerae* dirangsang oleh penambahan 1% natrium klorida (NaCl), perbedaan penting dari *Vibrio sp.* lainnya adalah kemampuan *Vibrio cholerae* tumbuh dalam kaldu nutrisi tanpa ditambahkan NaCl.⁷ Bakteri *Vibrio cholerae* dapat tumbuh pada media yang mengandung 6% NaCl, karena bakteri *Vibrio cholerae* merupakan bakteri halofilik (bakteri yang dapat tumbuh pada kadar garam tinggi).⁸ *Alkaline Peptone Water* (APW) merupakan salah satu media yang menguntungkan pertumbuhan mikroorganisme tertentu, karena mengandung bahan-bahan tambahan ataupun bahan penghambat yang menekan tumbuhnya kompetitor. Jenis media ini juga bertujuan untuk meningkatkan jumlah mikroorganisme yang diduga terlalu sedikit dalam bahan sampel, sehingga akan mudah untuk dihitung atau dianalisa lebih lanjut. Komposisi media APW pertama kali dibuat oleh Shread, Donovan dan Lee pada tahun 1991 yang akan digunakan sebagai pengayaan kaldu non-selektif untuk budidaya *Aeromonas sp.* Media APW berfungsi sebagai sumber nutrisi yang diperlukan bakteri, mengandung NaCO₃ bersifat basa yang mengatur pH media 8,5-9,5 dan berperan dalam menjaga tekanan osmotik media.⁹ Tekanan osmotik yang tinggi dapat menyebabkan air keluar dari dalam sel bakteri. Penambahan garam dalam

larutan akan meningkatkan tekanan osmotik. Konsentrasi garam atau gula yang tinggi menyebabkan air keluar dari sel bakteri sehingga menghambat pertumbuhan atau menyebabkan plasmolisis (pecah/lisisnya suatu sel).¹⁰

Beberapa penelitian terkait identifikasi *Vibrio cholerae* dengan menggunakan APW, antar lain identifikasi bakteri *Vibrio cholerae* pada makanan sushi isi daging ikan mentah dengan menggunakan metode media APW 3% dan dari 6 sampel yang diteliti tidak ditemukan bakteri *Vibrio cholerae*.¹¹ Penelitian tentang Skrining Bakteri *Vibrio sp.* asli Indonesia, penelitian tersebut menunjukkan bahwa dari 10 sampel yang diteliti teridentifikasi 7 sampel terdapat bakteri *Vibrio cholerae*.¹² Penelitian tentang identifikasi serotipe bakteri *Vibrio cholerae* dengan menggunakan metode media APW (*Double strength*), dimana hasilnya menunjukkan bahwa dari 12 sampel penelitian 10 sampel mengandung bakteri *Vibrio cholerae*.¹³ Penelitian tentang studi pada pasien yang menderita penyakit kolera di India menunjukkan bahwa dari 32 sampel

METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Pebruari sampai dengan Maret 2014. Bahan penelitian antara lain kultur murni *Vibrio cholerae*, media TCBS agar, media APW, NaCl, NaOH 0,01 N, kertas pH, aquadest, kapas berlemak dan tissue. Alat yang digunakan dalam penelitian, yaitu timbangan analitik, gelas arloji, api bunsen, ose, inkubator, petridisk steril, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *autoclave*, spektrofotometer, pipet ukur dan *push ball*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap.

Perlakuan berupa konsentrasi NaCl yang terdiri dari beberapa tingkat konsentrasi yaitu: konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%. Perlakuan diulang 3 kali, sehingga didapatkan 18 unit penelitian. Variabel yang diamati meliputi *absorbance* kekeruhan media APW, jumlah koloni, ukuran koloni, warna koloni, tekstur koloni dan konsistensi koloni.

Analisis varians dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer (*software*), terhadap data kuantitatif penelitian (yaitu: *absorbance* APW, jumlah koloni dan ukuran koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media TCBS agar), sedangkan analisis diskriptif dilakukan pada data penelitian yang berupa data kualitatif (yaitu warna koloni, tekstur koloni, dan konsistensi koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media TCBS agar).^{15,16}

didapatkan 15 sampel diantaranya terinfeksi bakteri *Vibrio cholerae*.¹⁴

Berdasarkan paparan diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh natrium klorida dengan konsentrasi yang berbeda pada media APW, terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*, sehingga diperoleh informasi mengenai metode dan isolasi bakteri *Vibrio cholerae* yang lebih tepat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Data yang didapat dari hasil penelitian tercantum seperti pada berikut ini:

Tabel 1. Data hasil penelitian

No	Konsentrasi	Hasil Penelitian					
		1	2	3	4	5	6
1	0%	0,12	525	1,2	kuning muda	Smooth/halus	Mucoid/berlendir
2	1%	0,11	488,33	1,2	kuning muda	Smooth/halus	Mucoid/berlendir
3	2%	0,07	279,67	1,53	kuning muda	Smooth/halus	Mucoid/berlendir
4	3%	0,06	185,33	1,57	kuning muda	Smooth/halus	Mucoid/berlendir
5	4%	0,03	4,67	2,23	kuning tua	Smooth/halus	Mucoid/berlendir
6	5%	0,01	3,67	3,0	kuning tua	Smooth/halus	Mucoid/berlendir

Keterangan: 1= Hasil pengukuran *absorbance* media APW.

2= Jumlah koloni *Vibrio cholerae* (CFU).

3= Ukuran koloni *Vibrio cholerae* (mm).

4= Warna koloni *Vibrio cholerae*.

5= Tekstur koloni *Vibrio cholerae*.

6= Konsistensi koloni *Vibrio cholerae*.

Pada hasil *absorbance* konsentrasi APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, pada analisa selanjutnya dilakukan uji stastik *Kruskal Willis*, dan didapatkan hasil nilai $p=0,005$.

Pada hasil jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh dimedia agar TCBS yang dikultur dari media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, pada analisa selanjutnya dilakukan uji stastik *One Way – ANOVA*, dan didapatkan hasil nilai p yang berkisar $\leq 0,05$ pada hampir semua konsentrasi APW yang dibandingkan, hanya pada konsentarsi APW 3% dengan konsentrasi 5%, serta konsentrasi APW 4% dengan konsentrasi 5% yang didapatkan nilai $p>0,05$.

Pada hasil ukuran koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh dimedia agar TCBS yang dikultur dari media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, pada analisa selanjutnya dilakukan uji stastik *Kruskal Willis*, mendapatkan nilai $p=0,006$, yang berarti $p \leq \alpha (0,05)$.

Pada pengamatan visual warna koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh dimedia agar TCBS yang dikultur dengan media APW 0%, 1%, 2%, dan 3%, menghasilkan warna koloni bakteri *Vibrio cholerae* kuning muda, dan pada media agar TCBS yang dikultur dari media APW 4% dan 5%, menghasilkan warna koloni bakteri *Vibrio cholerae* kuning tua.

Pada pengamatan visual tekstur koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh dimedia agar TCBS yang dikultur dengan media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, menghasilkan tekstur koloni bakteri *Vibrio cholerae* *smooth*/halus.

Pada pengamatan visual konsistensi bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh dimedia agar TCBS yang dikultur dengan media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, menghasilkan konsistensi bakteri *Vibrio cholerae* *mucoid*/berlendir.

Pembahasan

1. Pengukuran absorbansi kekeruhan media APW.

Tingkat keasaman/pH optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* adalah 7,0 tetapi bakteri ini toleran pada pH alkalis sampai 9,0, oleh karena itu pH alkalis ini dijadikan dasar untuk membuat media isolasi *Vibrio cholerae*. Pada tingkat keasaman/pH asam $\leq 6,0$ bakteri ini akan mati, sebagai media selektif untuk bakteri ini adalah agar TTGA/*Tellurite Taurocholate Gelatin* atau agar TCBS/*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose*. *Vibrio cholerae* umumnya memfermentasi sukrosa dan manosa tetapi tidak memfermentasi arabinosa.¹⁷

Pada pengukuran kekeruhan media APW yang telah diberi suspensi bakteri *Vibrio cholerae*, saat pembuatan suspensi bakteri *Vibrio cholerae* yang digunakan adalah bakteri stock murni yang mempunyai waktu inkubasi 24 jam, dan pembuatan suspensi bakteri *Vibrio cholerae* menggunakan pelarut aquadest steril. Suspensi bakteri *Vibrio cholerae* yang akan dimasukkan ke media APW adalah dengan menyamakan nilai *absorbance* suspensi bakteri *Vibrio cholerae* dengan larutan Mc.Farland 0.5, dengan blangko pada pengukuran adalah aquadest steril.

Pada pengukuran kekeruhan media APW yang telah diberi suspensi bakteri *Vibrio cholerae* yang telah diinkubasi, pada suhu 37°C selama 24 jam, didapatkan hasil *absorbance* yang berbeda saat diukur dengan spektrofotometer dengan $\lambda=500\text{nm}$. Pada pengukuran dengan spektrofotometer nilai *absorbance* sampel berbanding lurus dengan kekeruhan media APW, yang artinya semakin besar nilai *absorbance* suatu media APW,

bermakna semakin keruh media tersebut, hal ini yang terjadi pada konsentrasi APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, sedangkan hasil *absorbance* konsentrasi APW 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%, adalah: 0,000 yang mana nilai ini setara dengan nilai kontrol media APW steril yang digunakan sebagai blangko pada pengukuran pada spektrofotometer, dan juga setara dengan media kontrol APW (media APW yang tidak diberi NaCl dan suspensi kuman) yang diinkubasi secara bersamaan saat uji konsentrasi APW dikerjakan.

Pertumbuhan mikroorganisme pada medium cair dapat dideteksi berdasarkan warna kekeruhan yang dihasilkan oleh medium cair tersebut. Tingkat kekeruhan medium cair tersebut dapat diukur secara kuantitatif dengan menyinari medium cair tersebut suatu berkas cahaya, maka jumlah cahaya yang dapat ditransmisikan menembus medium cair tersebut akan berkurang, dalam teknik ini semua sel mikroba baik yang hidup maupun yang mati akan terhitung.¹⁸

2. Jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae*.

Bakteri akan bereproduksi/membelah diri pada medium agar dan membentuk koloni setelah 18-24 jam inkubasi. Untuk menghitung jumlah koloni dalam cawan petri dapat digunakan alat *colony counter* yang biasanya dilengkapi dengan pencatat elektronik. Pertumbuhan bakteri yang terus menerus akan menyebabkan kompetisi dalam mendapatkan nutrisi/bahan makanan antara sel inang dengan sel hasil pembelahan/pertumbuhan.

Pada pengukuran jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh di media agar TCBS, yang telah

dikultur dengan media APW. Perhitungan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* ini menggunakan alat *colony counter*. Pada agar TCBS yang terdapat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* adalah agar TCBS yang dikultur dari media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, sedangkan pada agar TCBS yang dikultur media APW 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%, tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*, hal ini sama dengan media agar TCBS yang di kultur dengan media APW kontrol (media APW yang tidak diberi NaCl dan suspensi kuman).

Pada hasil percobaan, konsentrasi media APW yang rendah, maka jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media agar TCBS adalah paling banyak, dan begitu sebaliknya pada konsentrasi media APW yang tinggi, maka jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media agar TCBS adalah paling sedikit.

3. Ukuran koloni bakteri *Vibrio cholerae*.

Pada ukuran koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh di media agar TCBS, yang telah dikultur dengan media APW. Pengukuran ini dilakukan dengan alat jangka sorong yang mempunyai tingkat ketelitian 0,01mm. Pada media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% dapat dilakukan pengukuran bakteri, sedangkan pada media APW 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10% tidak dapat dilakukan pengukuran bakteri, karena tidak ada pertumbuhan pada media TCBS. Pada konsentrasi media APW yang rendah, didapatkan ukuran koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh adalah paling kecil, dan pada konsentrasi media APW yang tinggi, maka ukuran koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh adalah paling besar.

Bakteri *Vibrio cholerae* pada media TCBS yang dinkubasi selama 18-24 jam memiliki ukuran diameter 2-3 mm.¹⁹ Ukuran bakteri dipengaruhi oleh keadaan lingkungan, medium dan usia. Pada umumnya bakteri yang usianya lebih muda ukurannya relatif lebih besar daripada yang sudah tua. Ukuran bakteri ini juga dipengaruhi oleh jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada suatu media. Semakin banyak suatu bakteri tumbuh pada suatu media menyebabkan persaingan dalam ruang/tempat hidup bakteri tersebut, sehingga pembelahan/pertumbuhan koloni bakteri dapat menjadi baik, ataupun sebaliknya, dapat juga terjadi persaingan dalam mendapatkan nutrisi pada media tersebut, dan persaingan antara bakteri dapat terjadi antara spesies bakteri, maupun bakteri yang tumbuh dengan bakteri inangnya.¹⁸

4. Warna koloni bakteri *Vibrio cholerae*.

Pada warna koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh di media agar TCBS, pengamatan dilakukan secara visual. Pada media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% dapat dilakukan pengamatan warna koloni bakteri, sedangkan pada media APW 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10% tidak dapat dilakukan pengamatan warna koloni bakteri, karena tidak ada pertumbuhan pada media TCBS.

Isolasi dan pembiakan bakteri *Vibrio cholerae*, dapat menggunakan media *Thiosulfate-citrate-bile salts agar* (TCBS) yang merupakan media selektif untuk isolasi dan pemurnian *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* mampu menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon akan berwarna kuning, sedangkan bakteri yang lainnya berwarna hijau. Warna pada koloni bakteri *Vibrio cholerae*

merupakan ciri khas dari bakteri yang bersangkutan, dimana intensitas yang terjadi merupakan tanda dari bakteri yang baik atau tidak, bakteri *Vibrio cholerae* yang baik akan berwarna kuning tua, menandakan cukupnya sumber nutrisi yang tersedia, inkubasi yang baik. Bakteri yang telah disimpan dan beberapa lama dalam suhu 4°C, pada saat dikultur kembali ke media selektif, dan diinkubasi 18-24 jam akan memberi warna yang berbeda sesuai dengan warna koloni bakteri yang sebenarnya, karena mekanisme dalam suhu 4°C, dimana bakteri tidak aktif membelah.²⁰

Pada pengamatan visual warna koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media APW 0%, 1%, 2%, dan 3%, menghasilkan warna koloni bakteri *Vibrio cholerae* kuning muda, pada saat kultur media TCBS. Sedangkan pada media APW 4%, dan 5%, menghasilkan warna koloni bakteri *Vibrio cholerae* kuning tua, pada saat kultur media TCBS.

5. Tekstur dan konsistensi koloni bakteri *Vibrio cholerae*.

Pada tekstur dan konsistensi koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang tumbuh di media agar TCBS, pengamatan dilakukan secara visual. Pengamatan visual tekstur dan konsistensi koloni bakteri *Vibrio cholerae* dilakukan pada media APW 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, sedangkan pada media APW 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, tidak dapat dilakukan pengamatan visual terhadap tekstur dan konsistensi koloni bakteri karena tidak ada pertumbuhan bakteri di media TCBS.

Pada biakan media pertumbuhan selektif agar TCBS, bakteri *Vibrio cholerae* yang diinkubasi selama 18-24 jam akan membentuk koloni bakteri yang cembung (*convex*), halus dan bulat yang keruh

(*opaque*), *mucoïd*, dan bergranul bila terkena cahaya.²¹ Pada pengamatan visual tekstur koloni bakteri, didapatkan hasil tekstur koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang *smooth*/halus. Pada pengamatan visual konsistensi koloni bakteri, didapatkan hasil konsistensi koloni bakteri *Vibrio cholerae mucoïd*/berlendir.

Tekstur dan konsistensi koloni bakteri berhubungan dengan inkubasi baik, suhu inkubasi, waktu inkubasi, ataupun ketersediaan O₂. Bakteri mempunyai suhu optimal dimana bakteri tersebut dapat tumbuh, namun bakteri mempunyai suhu minimum dan maksimum untuk tumbuh, namun pada suhu ini bakteri tidak dapat tumbuh sebaik suhu optimal. Waktu inkubasi bakteri akan mempengaruhi tekstur koloni, bakteri yang diinkubasi ≥ 48 jam, pada suhu 37°C akan lebih kering, daripada bakteri yang diinkubasi 18-24 jam, pada suhu 37°C.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh konsentrasi NaCl yang ditambahkan pada media APW terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* dimana konsentrasi 0% menghasilkan nilai absorbance kekeruhan yang paling besar, jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang paling banyak. Sedangkan konsentrasi APW 5% menghasilkan ukuran koloni bakteri *Vibrio cholerae* yang paling besar. Disamping itu penambahan NaCl pada media APW mengakibatkan perbedaan warna koloni bakteri *Vibrio cholerae*, tetapi tidak terdapat perbedaan tekstur bakteri dan perbedaan keadaan koloni bakteri.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disampaikan saran sebagai berikut:

1. Untuk mengisolasi/menumbuhkan bakteri *Vibrio cholerae* dari stock murni dapat digunakan media APW tanpa penambahan NaCl (APW 0%), sedangkan untuk mengisolasi bakteri *Vibrio cholerae* dari sampel/row material perlu ditambahkan NaCl (APW 5%) untuk menghambat pertumbuhan bakteri pengganggu yang tidak diinginkan.
2. Untuk peneliti berikutnya dapat dilanjutkan dengan meninjau beberapa variabel antara lain lama waktu inkubasi dan kompetisi bakteri *Vibrio cholerae* dengan bakteri lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ineke. Healty Live: Makalah Diare Pada Anak [online] 2013 [cited 20 Pebruari 2014]. Available from: <http://www//inekehr.blogspot.com/2013/06/makalah-diare-pada-anak.html>.
2. Gunawan. Tinjauan Pustaka: Pengertian diare [online] 2010 [cited 18 Pebruari 2014]. Available from: <http://www//repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/19780/4/Chapter%20II.pdf>.
3. Pelczar, and Chan. Dasar-Dasar Mikrobiologi II. Jakarta: Universitas Indonesia; 2005.
4. Adisasmito. Makara Kesehatan Journal Faktor Resiko Pada Bayi dan Balita Di Indonesia: Systemik Riview Penelitian Akademik Bidang Kesehatan Masyarakat. Jakarta: Universitas Indonesia; 2007.
5. Pusat Data dan Informasi KEMENKES R.I. Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan: Situasi Diare di Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan R.I.; 2011.
6. Holt. Bergey's Manual of Determenation Bacteriology. Ed 9th. Philadhelpia: Lippincott Williams & Wilkins; 1994.
7. World Helth Organization. *Vibrio cholerae*. Jenewa: World Helth Organization; 2000.
8. Jawetz, Melnick, and Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: EGC; 2007.
9. Oxoid. Alkaline Pepton Water. England: Oxoid; 2001.
10. Maksum Radji. Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi dan kedokteran. Jakarta: EGC; 2010.
11. Astuti. Identifikasi Bakteri *Vibrio cholera* Pada Makanan Sushi *Isi Daging Ikan Mentah* dijual di Mall Citraland. Semarang: Universitas Muhamadiyah Semarang; 2008.
12. Felix, Nugroho, Silalahi, dan Octavia. Skrining Bakteri *Vibrio sp.* Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16S Ribosomal DNA [online] 2011 [cited 18 Pebruari 2014]. Available from: <http://www.SKRINING-BAKTERI-VIBRIO-SP-ASLI-INDONESIA-SEBAGAI-PENYEBAB-PENYAKIT-UDANG-BERBASIS-TEHNIK-16S-RIBOSOMAL-DNA.pdf>.
13. Ananta, Wijaya, Dhinarananta, Yuniadi, dan Hendrayana. 2010. Identifikasi Serotipe Bakteri *Vibrio cholerae* Terisolasi Dari Es Batu Pengawet Ikan Yang Digunakan Oleh Pedagang Hasil Laut Pasar Modern dan Pasar Tradisional Di Kota Denpasar [online] 2010 [cited 18 Pebruari 2014]. Available from: <http://portalgaruda.org/download/article.php?article=82549&val=970>.
14. Taneja. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 Biotipe E1 Tor Serotype Inaba in North India. Japan: Journal of Inectious Disease; 2005.
15. Baroroh. Trik-trik Analisis Statistik. Jakarta: PT. Gramedia; 2008..
16. Sugiyono. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D. Bandung: CV ALFABETA; 2013.

17. Wolfgang K. Joklik, Dphil., Hilda P. Willett., D. Bernard Amos., Catherine M. Wilfert. *Zinsser Microbiology*. 20th Ed. English: Appleton & Lange; 1997.
18. Rukmi, MG. I., A. T. Lunggani, A. Supriyadi. Perhitungan Jumlah Mikrobiologi [online] 2008 [cited 7 April 2014]. Available from: <http://journal.disoveryindonesia.com/PDFinterstitial,perhitungan+jumlah+mikroba.id>.
19. Marlina, Dedy Almasdy, Insanil Aufa. Deteksi Gen *ctx* pada Bakteri *Vibrio cholerae* Isolat Limbah Cair Rumah Sakit dan Uji Resistensinya Terhadap Beberapa Antibiotik [online] 2007 [cited 7 April 2014]. Available from: http://repository.unand.ac.id/967/1/JSTF_Marlina_Sanil.doc.
20. Ulfa Falahiyati, Riska Setya W., Amanda Arum K. 2013. *Vibrio cholera* [online] 2013 [cited 7 April 2014]. Available from: http://www.slideshare.net/falahi_ulfa/vibrio-cholerae.
21. M.M Levine and J.B Kaper. *Cholera and the Ecology of Vibrio cholerae*. London: Chapman & Hall; 1996.