

**PS1
13**

Jakarta

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Peningkatan Sensitifitas Uji Diagnostik cepat Koaglutinasi dan Strip Menggunakan Beberapa Medium Pengayaan untuk Deteksi *Vibrio cholerae* O1 pada Spesimen



Nama Penyusun Laporan :

- 1. Kambang Sariadji**
- 2. Anis Karuniawati**
- 3. Conny Tjampakasari**
- 4. Sunarno**

**Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kemenkes RI
Tahun 2011**

Lembaga Penelitian dan Pengembangan Kesehatan

PERPUSTAKAAN

Tanggal : 30-8-2012

No. Index : PS1-13/2012

No. Riass : PS1

13

PENINGKATAN SENSITIFITAS UJI DIAGNOSIS CEPAT KOAGLUTINASI DAN STRIP MENGGUNAKAN BEBERAPA MEDIUM PENGAYAAN UNTUK DETEKSI *Vibrio cholerae* O1 Pada Spesimen

Kambang Sariadji

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan , Kemenkes RI

ABSTRAK

Vibrio cholerae O1 adalah agent bakteri yang dapat menimbulkan wabah kolera di negara berkembang. Saat ini metode baku diagnosis bakteri *V.cholerae* O1 adalah dengan kultur dan isolasi yang memerlukan waktu 3 – 5 hari. Diagnosis alternatif lainnya dengan metode rapid immunokromatografi strip test dan koaglutinasi. Metode rapid ini mempunyai keterbatasan mendeteksi jumlah *V.cholerae* O1 minimal 10^5 - 10^6 cfu/mL dan dapat ditingkatkan dengan medium pengayaan yang diinkubasi selama 6 - 8 jam pada suhu 37°C. Beberapa medium pengayaan yang digunakan untuk perbanyakkan *V.cholerae* adalah air peptone alkali (APW), *bismuth sulfite* (BS), dan medium *gelatin phosphate salt broth*(GPSB). Penelitian bertujuan untuk meningkatkan sensitifitas uji diagnosis cepat *V.cholerae* O1 menggunakan beberapa medium pengayaan.

Pengujian dilakukan dengan menggunakan suspensi *V.cholerae* O1 0,5 MacFarland setara dengan 10^8 CFU/mL dan dibuat serial pengenceran 10^7 - 10^1 . Suspensi serial ini diinokulasikan dengan dan tanpa feses orang sehat ke tiap medium pengayaan pada suhu 37°C dan 42°C selama 8 jam. Tiap jam diukur pertumbuhan bakteri dengan alat nefelometer dan hitung koloni serta deteksi *V.cholerae* O1 juga dilakukan dengan strip immunokromatografi dan koaglutinasi.

Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada tiap medium ($P<0,01$). Nilai rata – rata pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada medium APW suhu 42°C lebih baik dibandingkan medium BS dan GPSB. Pada pertumbuhan *V.cholerae* O1 dengan penambahan feses normal menunjukkan ada perbedaan pertumbuhan pada medium APW dan GPSB ($P<0,01$). Nilai rata – rata pertumbuhan bakteri pada medium APW suhu 42°C adalah 7,22 lebih tinggi dibandingkan nilai rata – rata pada medium APW suhu 37°C 6,56, medium GPSB suhu 37°C adalah 4,93 dan GPSB suhu 42°C adalah 5,72. Hasil uji medium pengayaan dalam meningkatkan sensitifitas uji diagnostik *V.cholerae* O1 strip dan koaglutinasi menunjukkan medium APW lebih cepat meningkatkan deteksi *V.cholerae* O1 daripada GPSB. Sementara sensitifitas metode koaglutinasi lebih baik dibandingkan metode strip.

Kata Kunci : *V.Cholerae*, Uji diagnostik cepat , Medium Pengayaan

SUSUNAN TIM PENELITI

No.	Nama	Keahlian / Kesarjanaan	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1	Kambang Sariadji S.Si.	Sarjana Biologi	Peneliti (Ketua Pelaksana)	Bertanggung jawab terhadap seluruh kegiatan penelitian dan sebagai ketua pelaksana
2	Sumarno SKp.M.Biomed	S2 Biologi Medik	Peneliti	Bertanggung jawab terhadap pemeriksaan Isolasi dan kultur Bakteri
3	Melati wati	Analisis Kesehatan	Pembantu Peneliti	Bertanggung Jawab terhadap pemeriksaan diagnosis cepat
4	Syamsidar	Analisis Kesehatan	Pembantu Peneliti	Bertanggung Jawab terhadap pembuatan media
5	Max Bobby S.E	Administrasi	Pembantu Administrasi	Bertanggung jawab atas keperluan administrasi penelitian
6	dr. Anis Karuniawati., PhD, SpMK.	Dokter, Microbiologis	Nara Sumber	Membantu Peneliti utama pada saat konsultasi seminar
7	Dra. Conny Riana Tjampakasari ,DMM,M.Biomed	Microbiologis	Nara Sumber	Membantu Peneliti utama pada saat konsultasi seminar

DAFTAR ISI

BAB	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
ABSTRAK.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
PENDAHULUAN	1
HIPOTESIS	3
TUJUAN	3
MANFAAT	4
METODE	5
a. Kerangka konsep	5
b. Desain penelitian	5
c. Alur penelitian	5
d. Cara pengumpulan data	8
e. Bahan dan cara kerja	9
f. Analisis dan penyajian data	12
HASIL	13
a. Optimasi reagen koaglutinasi	13
b. Hasil uji medium pengayaan dengan isolat <i>V.cholerae</i>	15
c. Hasil biakan feses orang sehat	20
d. Hasil uji medium pengayaan dengan isolat <i>V.cholerae</i> + feses orang sehat	20
PEMBAHASAN	26
KESIMPULAN DAN SARAN	31
UCAPAN TERIMA KASIH	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Hasil uji titer antisera <i>Vibrio cholerae</i> O1 polivalen.....	13
Tabel 2	Limit deteksi uji koaglutinasi <i>V.cholerae</i> O1 secara makroskopik dan mikroskopik	14
Tabel 3	Hasil biakan bakteri feses orang sehat	20
Tabel 4	Uji Kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^4 CFU/mL.....	23
Tabel 5	Uji Kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^3 CFU/mL.....	24
Tabel 6	Uji Kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^2 CFU/mL.....	24
Tabel 7	Uji Kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^1 CFU/mL.....	25
Tabel 8	Nilai rata – rata pertumbuhan bakteri <i>V.cholerae</i> O1 pada ketiga medium.....	28
Tabel 9	Nilai rata – rata pertumbuhan bakteri <i>V.cholerae</i> O1 pada kedua medium.....	28

SUSUNAN TIM PENELITIAN

No.	N a m a	Keahlian / Kesarjanaan	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1	Kambang Sariadji S.Si.	Sarjana Biologi	Peneliti (Ketua Pelaksana)	Bertanggung jawab terhadap seluruh kegiatan penelitian dan sebagai ketua pelaksana
2	Sunarno SKp.M.Biomed	S2 Biologi Medik	Peneliti	Bertanggung jawab terhadap pemeriksaan Isolasi dan kultur Bakteri
3	Melati wati	Analisis Kesehatan	Pembantu Peneliti	Bertanggung Jawab terhadap pemeriksaan diagnosis cepat
4	Syamsidar	Analisis Kesehatan	Pembantu Peneliti	Bertanggung Jawab terhadap pembuatan media
5	Max Bobby S.E	Administrasi	Pembantu Administrasi	Bertanggung jawab atas keperluan administrasi penelitian
6	dr. Anis Karuniawati., PhD, SpMK.	Dokter, Microbiologis	Nara Sumber	Membantu Peneliti utama pada saat konsultasi seminar
7	Dra. Conny Riana Tjampakasari ,DMM,M.Biomed	Microbiologis	Nara Sumber	Membantu Peneliti utama pada saat konsultasi seminar

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Uji sensitifitas reagen koaglutinasi.....	14
Gambar 2.	Uji spesifitas reagen koaglutinasi.....	15
Gambar 3.	Kurva pertumbuhan <i>V.cholerae</i> pada medium pengayaan.....	17
Gambar 4.	Kurva pertumbuhan <i>V.cholerae</i> dengan serial pengenceran 10 ⁴ CFU/mL suhu 37°C dan 42°C.....	18
Gambar 5.	Kurva pertumbuhan <i>V.cholerae</i> dengan serial pengenceran 10 ⁷ , 10 ⁴ , 10 ³ CFU/mL suhu 42°C.....	19
Gambar 6.	Kurva pertumbuhan <i>V.cholerae</i> O1 + feses normal .Sebanyak 10 ⁴ dan 10 ³ CFU/mL.....	21
Gambar 7.	Kurva pertumbuhan <i>V.cholerae</i> O1 + feses normal. Sebanyak 10 ² dan 10 ¹ CFU/mL.....	22

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Bahan dan alat	36
Lampiran 2	Data hasil uji pertumbuhan <i>V.cholerae</i> O1 pada medium Pengayaan	38
Lampiran 3	Uji statistik pertumbuhan <i>V.cholerae</i> O1 pada medium pengayaan	41
Lampiran 4	Hasil uji diagnosis cepat dengan spesimen <i>V.cholerae</i> O1 + feses orang Sehat dalam medium pengayaan	43
Lampiran 5	Uji statistik <i>V.cholerae</i> O1 + feses normal dalam medium pengayaan	45

1. PENDAHULUAN

Vibrio cholerae adalah bakteri gram negatif penghasil enterotoksin yang dapat menimbulkan infeksi saluran cerna dengan gejala muntah, buang air besar seperti air cucian 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

Angka kejadian kasus kolera yang tinggi umumnya terjadi di negara yang sedang berkembang akibat higiene dan sanitasi yang buruk serta penyediaan air minum yang kurang memadai. Air memegang peran utama dalam terjadinya wabah penularan di daerah pedesaan tempat kolera berjangkit sebagai endemik. *Vibrio cholerae* banyak ditemui di permukaan air yang terkontaminasi dengan feses penderita kolera².

Kolera telah dilaporkan sebagai penyebab kejadian luar biasa (KLB) di berbagai negara. Tahun 2003 WHO menerima laporan 11.575 kasus kejadian kolera dari 45 negara dan 1.894 diantaranya dilaporkan meninggal. Mayoritas kasus kolera tersebut terjadi di sebagian besar negara Afrika.³ Tercatat angka KLB kolera di Indonesia antara tahun 1993 – 1998 sebanyak 9 % disebabkan oleh bakteri *V.cholerae* O1 dan kurang dari 1% disebabkan oleh bakteri *V.cholerae* non O1. Dari 13 daerah angka KLB kolera yang tertinggi adalah daerah Bandung, Garut dan Timika. Hal ini karena tingkat sanitasi dan higiene yang buruk. Selain itu musim kemarau juga ikut berpengaruh dalam meningkatkan kejadian kolera.⁴ Pada bulan Juni 2005 Dirjen P2PL Dep-Kes melaporkan Kejadian Luar Biasa kolera di daerah Tangerang yang mengakibatkan korban meninggal 20 orang dari 362 kasus.⁵ Data KLB kolera terakhir terjadi di Timika, kabupaten Mimika, provinsi Papua yang menewaskan hampir 108 orang antara bulan April sampai Agustus 2008.⁶

Saat ini metode pemeriksaan yang digunakan untuk mendukung diagnosis *V.cholerae* masih dilakukan secara konvensional yaitu dengan cara membiakan, mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *V.cholerae* dalam waktu cukup lama (kurang lebih 5 hari) dan memerlukan fasilitas laboratorium yang memadai serta tenaga laboratorium yang terlatih. Pemeriksaan konvensional ini juga merupakan baku standar dalam diagnosis *V.cholerae* dari bahan pemeriksaan feses, muntahan atau *rectal swab*. Mengingat diagnosis kasus kejadian luar biasa kolera harus dilakukan segera untuk mendapatkan tindakan pengobatan dan pencegahan penyebaran penyakit ke lingkungan

sekitarnya, maka diperlukan uji diagnostik cepat dan tepat dengan sensitifitas dan spesifitas yang mendekati metode kultur. Selain cepat dan tepat metode yang diperlukan di lapangan adalah metode yang tidak memerlukan alat dan keterampilan khusus, biaya yang lebih murah daripada metode konvensional, serta dapat dikerjakan langsung di lokasi terjadinya wabah kolera.^{7,8,9,10}

Pada saat ini uji diagnosis cepat yang mungkin dapat memenuhi persyaratan tersebut adalah uji strip (*chromatographic immunoassay*) menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen lipopolisakarida *V.cholerae* O1 dan 139 dan koaglutinasi menggunakan protein A *Staphylococcus aureus* Cowan I yang dilapisi (*coated*) dengan anti serum anti *V.cholerae* O1. Metode uji strip mudah dilakukan dan memberikan hasil yang cepat (10 - 20 menit), tidak memerlukan banyak reagensia dan alat. Uji strip mempunyai spesifitas antara 84 - 100 % dan sensitifitas antara 94,2 - 100 %. Namun metode ini memerlukan konsentrasi minimal sel bakteri 10^5 - 10^6 /ml feses untuk memberikan hasil positif. Hasil yang optimal didapatkan bila didahului perbanyakan bakteri dengan cara menginokulasikan feses ke medium pengayaan dan diinkubasi 6 - 8 jam pada suhu 37 °C.^{11,12,13}

Uji diagnosis cepat dengan metode koaglutinasi sangat sederhana, murah, mudah dan cepat hasilnya (2 - 5 menit), tidak perlu banyak reagensia dan alat yang digunakan. Uji koaglutinasi ini mempunyai spesifitas antara 96,5 - 100 % dan sensitifitas 98,7 - 100 %. Seperti halnya uji strip, metode ini juga memerlukan konsentrasi sel bakteri yang tinggi, yaitu $>10^6$ /ml feses. Sehingga untuk mendapatkan hasil yang optimal diperlukan perbanyakan bakteri dengan cara menginokulasikan feses ke medium pengayaan dan diinkubasi 6 - 8 jam pada suhu 37 °C.⁹

Saat ini medium air pepton alkali (pH 9,0) digunakan sebagai medium pengayaan bakteri *Vibrio*, namun pada penerapannya belum diketahui kemampuan dalam memperbanyak jumlah sel bakteri bila dibandingkan medium pengayaan lainnya. Beberapa bakteri yang dapat hidup di medium air pepton alkali diantaranya adalah *V.cholerae*, *Vibrio paraemolyticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Streptococcus faecalis*.¹⁴ Medium pengayaan lainnya yakni kombinasi medium air pepton alkali dengan bismuth sulphite (pH 9,1) dan medium *gelatin phosphate salt broth* (pH 7,2) saat ini belum teruji sifat selektif dan kemampuan dalam memperbanyak jumlah sel bakteri *V.cholerae*. Sementara variasi suhu optimum inkubasi untuk pembiakan *Vibrio sp.* 37°C

dan 42° C dilakukan untuk mengetahui suhu inkubasi yang mana yang dapat memberikan suhu optimal bagi pertumbuhan *V.cholerae*.

Penambahan komponen bismuth sulphite pada medium air pepton alkali adalah untuk menghambat mikroorganisme lainnya. Adanya kandungan natrium nitrit dapat mempertahankan pH medium tetap alkali, sehingga diharapkan hanya jenis bakteri *Vibrio sp.* saja yang dapat tumbuh, sementara bakteri lainnya dapat dihambat.¹⁵

Pada penelitian ini metode diagnosis cepat dengan uji strip (*chromatographic immunoassay*) dan koaglutinasi untuk mendeteksi *vibrio cholerae* didahului dengan pembiakan bakteri dalam feses menggunakan beberapa medium pengayaan. Dari hasil medium pengayaan yang didapat dilakukan uji sensitifitas dan spesifitas terhadap uji diagnosis cepat metode koaglutinasi, kemudian dibandingkan juga dengan metode kultur yang merupakan standar baku emas. Penggunaan metode diagnosis cepat dengan perlakuan spesimen pada medium pengayaan diharapkan dapat meningkatkan temuan kasus kolera di lapangan.

2. HIPOTESIS

- Ada perbedaan kecepatan pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada beberapa medium pengayaan dengan suhu inkubasi 37°C dan 42°C.
- Ada perbedaan kecepatan pertumbuhan *V.cholera* O1 dengan penambahan feses orang sehat pada medium pengayaan dengan suhu inkubasi 37°C dan 42°C.
- Tidak ada perbedaan penggunaan uji diagnostik cepat strip dan koaglutinasi dalam mendeteksi *V.cholerae* O1.

3. TUJUAN

Tujuan Umum

Meningkatkan sensitifitas uji diagnostik cepat *Vibrio cholera* menggunakan medium pengayaan.

Tujuan Khusus

- Mengetahui kecepatan pertumbuhan *V.cholerae* pada medium air pepton alkali , air pepton alkali + Bismuth sulphite dan *gelatin phosphate salt broth*.
- Mengetahui kecepatan pertumbuhan *V.cholera* dengan penambahan feses orang sehat pada medium air pepton alkali , air pepton alkali + *Bismuthi sulphite* dan *gelatin phosphate salt broth*.

- Membandingkan penggunaan medium pengayaan untuk deteksi *V.cholerae* dengan uji strip dan uji koaglutinasi.

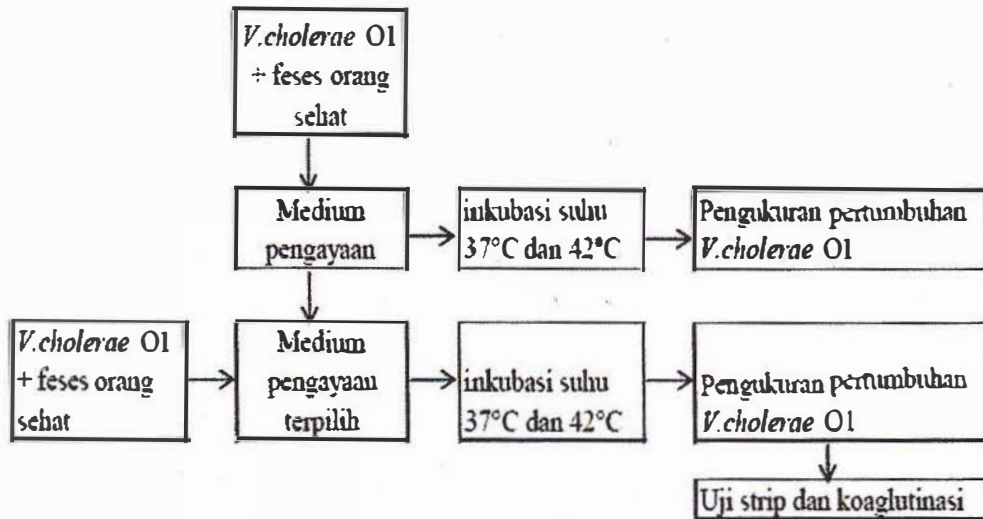
4. MANFAAT

Manfaat yang bisa didapatkan dari penelitian ini antara lain ;

- Bagi Pemerintah : dapat membantu deteksi dini kolera pada kasus kejadian luar biasa di Indonesia.
- Bagi Institusi : dapat menjadi rekomendasi pemakaian metode ini di lapangan dalam mendeteksi *Vibrio cholera* secara cepat
- Bagi masyarakat medis : dapat menjadi bahan rujukan dalam pengembangan diagnosis cepat *Vibrio cholerae* di Indonesia.

5. METODE

a. Kerangka Konsep



b. Desain Penelitian

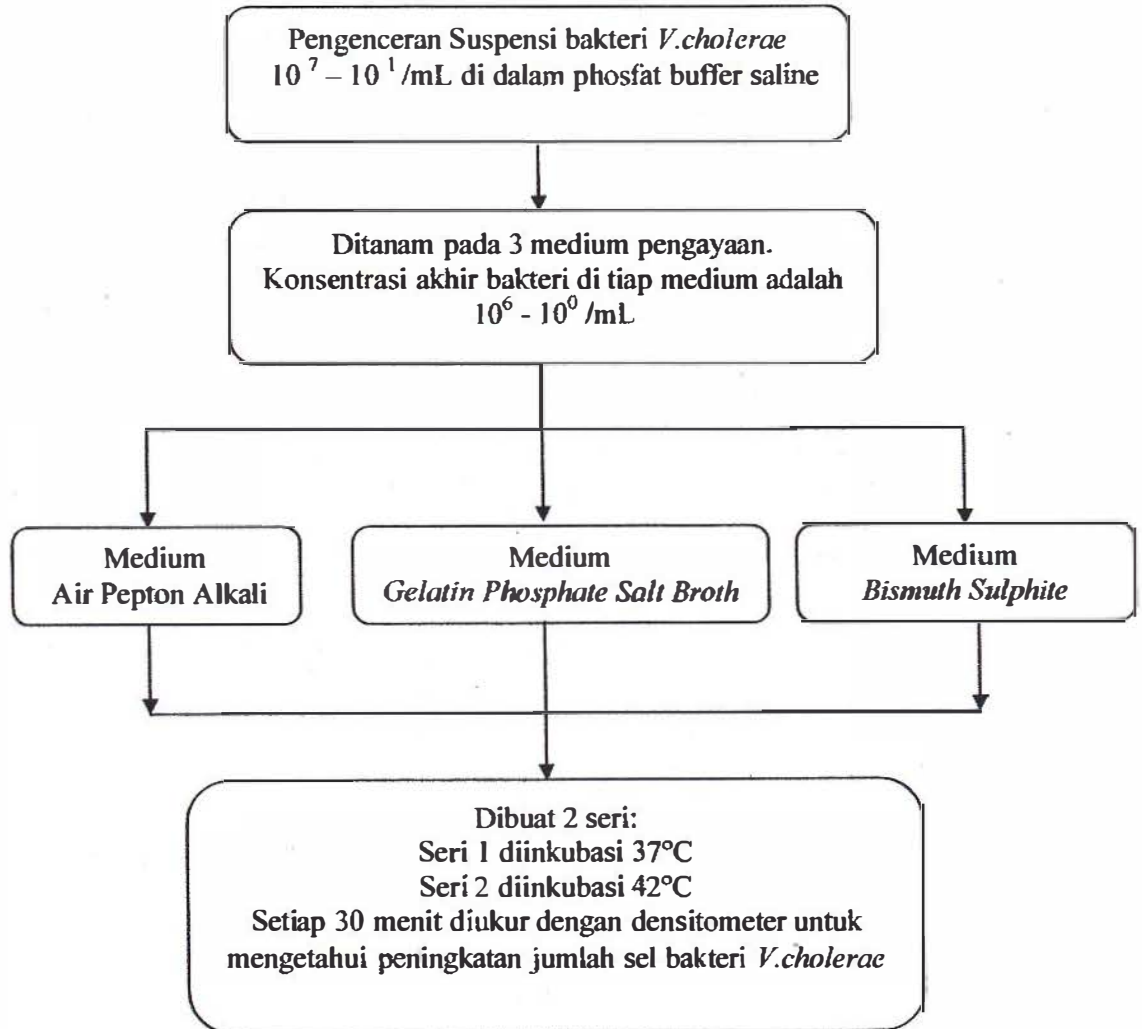
Merupakan penelitian eksperimental laboratorium

c. Alur Penelitian

- Tahap I :Pengujian medium pengayaan untuk pembiakan *V. cholerae* O1
- Tahap II :Pengujian medium pengayaan untuk pembiakan *V.cholerae* dengan penambahan feses orang sehat.
- Tahap II :Penentuan limit deteksi *V.cholerae* di dalam medium pengayaan uji strip
- Tahap IV : Optimasi reagen koaglutinasi
- Tahap V : Penentuan limit deteksi *V.cholerae* di dalam medium pengayaan menggunakan uji koaglutinasi.

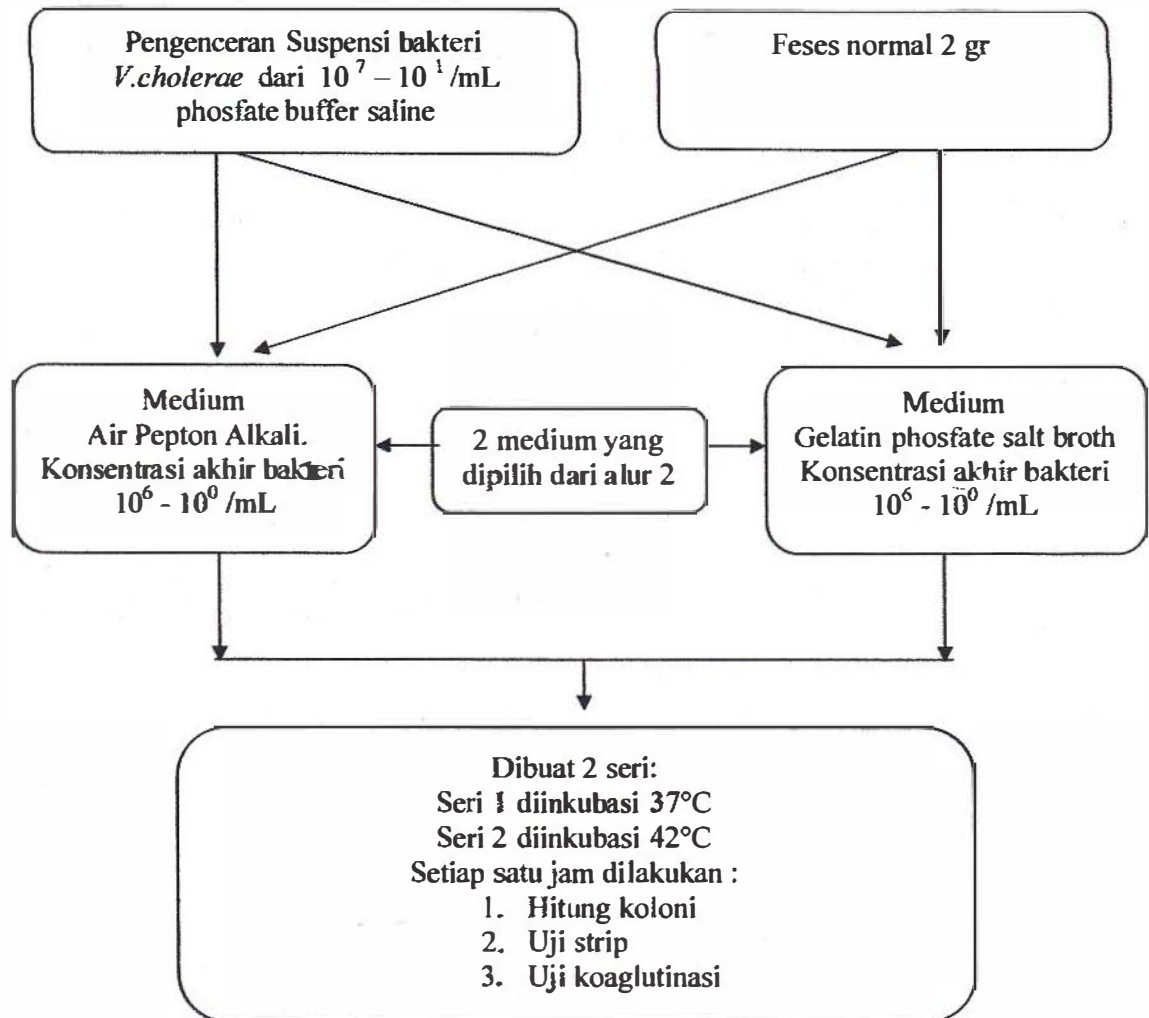
Alur Penelitian I

Penentuan kecepatan pertumbuhan *V.cholerae* pada 3 macam medium pengayaan



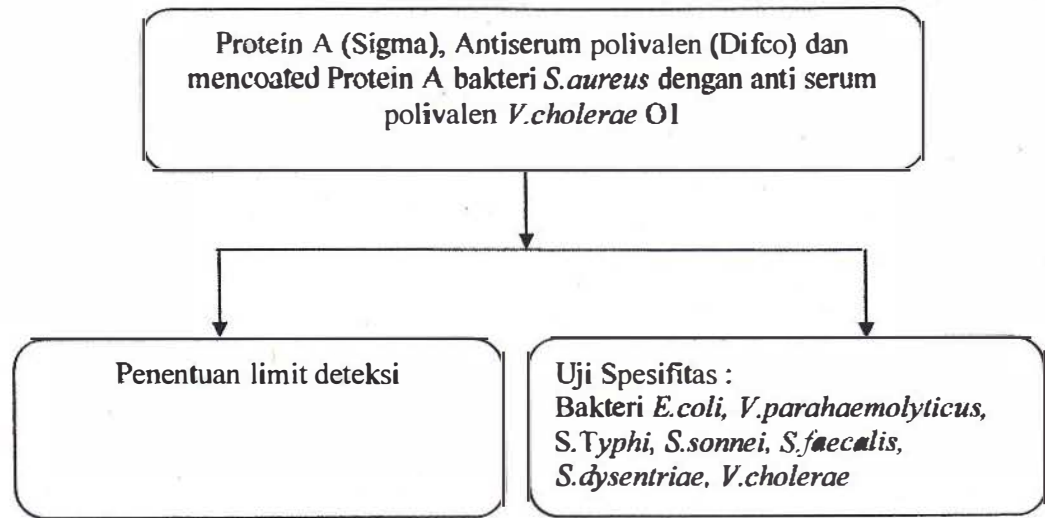
Alur Penelitian II

1. Pengujian kecepatan pertumbuhan 2 medium pengayaan dengan spesimen *V.cholerae* + feses orang sehat
2. Pengujian sensitifitas uji strip dan koaglutinasi



Alur penelitian III

Pembuatan dan Optimasi Reagen koaglutinasi



d. Cara pengumpulan data

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jl.Percetakan Negara 29 Jakarta Pusat. Waktu pelaksanaan penelitian mulai bulan Januari - Oktober 2011.

Sampel

Sampel penelitian ini merupakan sampel yang dibuat dengan berbagai pengenceran *V.cholerae* dan dengan penambahan feses orang sehat yang menggambarkan kondisi sampel yang sebenarnya pada keadaan diare kolera. Bakteri *V.cholerae* didapat dari stok isolat kasus kejadian luar biasa di Papua. Feses normal didapat dari orang sehat yang telah dilakukan pemeriksaan kultur terhadap bakteri enterik patogen

e. Bahan dan cara kerja

Persiapan pembuatan medium pengayaan

Tiga macam medium yang digunakan untuk pengayaan bakteri *Vibrio cholerae* yakni :

1. Medium air pepton alkali (APW) dengan komposisi pepton 10 gr dan NaCl 5 gr dilarutkan dalam 1 liter akuades . pH akhir diukur menjadi 9,1, kemudian dimasukkan ke dalam tabung bertutup sebanyak 18 mL dan 16 mL kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit.^{14,17}
2. Pembuatan Medium *Bismuth sulphite* (BS).¹⁵
 - Larutan A : Bismuth amonium citrate sebanyak 60 gr dilarutkan dalam 50 mL akuades dan ditambahkan 20 mL amonium hidroksida, dicampur dengan menggunakan magnetik stirer sampai larut, setelah larut ditambahkan akuades sebanyak 500 mL .
 - Larutan B : *Bismuth sulphite* stock ,dilarutkan sebanyak 20 gr anhidrate natrium sulphite dalam 100 mL akuades, kemudian tambahkan 2 mL larutan A. Dibuat juga larutan glukosa 20 gr dalam 100 mL air mendidih , biarkan dingin , kemudian ditambahkan ke larutan tersebut.
 - *Bismuth Sulphite Medium* : ke dalam medium air pepton alkali pH 9,1 sebanyak 100 mL ditambah 10 mL larutan B dan tambahkan 1 mL etanol absolut. pH akhir diukur menjadi 9,1. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 18 mL dan 16 mL, kemudian disterilisasi
3. *Medium gelatin phosphate salt broth* (GPSB) : ditimbang sebanyak 10 gr gelatin, NaCl 10 gr, dan K₂HPO₄ 5 gr , campur dan ditambahkan 1 liter akuadest. pH akhir diukur menjadi 7,2 ± 0,2. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung masing – masing sebanyak 18 mL dan kemudian disterilisasi.¹⁴

Persiapan biakan bakteri *V.cholerae*, patogen enterik dan feses normal

Biakan *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae dihidupkan kembali dari stok strain dengan menginokulasikan ke medium air pepton alkali 37° C selama 6 – 8 jam, kemudian disubkultur pada medium TCBS dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam. Pemeriksaan dilanjutkan dengan reaksi biokimia dan serologi menggunakan antisera polivalen *V.cholerae* O1 dan monovalen ogawa dan inaba pada koloni spesifik. Hasil strain bakteri *V.cholerae* yang

didapat dan berumur 24 jam merupakan bakteri yang akan digunakan untuk membuat suspensi bakteri 0,5 MacFarland.^{17,27}

Biakan bakteri enterik patogen

Beberapa bakteri patogen enterik lainnya yang digunakan untuk uji spesifitas dihidupkan kembali dari stok yaitu *Salmonella Typhi*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio parahaemolyticus*. *Salmonella* dan *Shigella* dibiakkan pada medium agar *Salmonella Shigella*, *V.Parahaemolyticus* pada medium TCBS lalu diinkubasi pada suhu 37°C, selama 18-24 jam. Selanjutnya dari koloni yang memiliki morfologi yang sesuai dilakukan identifikasi secara biokimia menggunakan *Kliger Iron Agar* (KIA), *Sucrose Semi Solid* (SSS), dan *Motility Indol Ornithine* (MIO) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian identifikasi dilanjutkan dengan uji serologi.

Biakan feses orang sehat yang akan digunakan untuk uji

Inokulasi feses ke dalam tabung kaldu selenite dan tabung APW (*Alkali Peptone Water*) lalu diinkubasi pada suhu 37°C, selama 18-24 jam. Selanjutnya disubkultur pada medium *Mac Conkey Agar* (MCA), *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dan TCBS dan inkubasi suhu 37°C selama 18-24 jam. Diambil koloni tersangka bakteri patogen yang spesifik pada medium MCA dengan warna merah pink, medium SSA dengan bening dan transparan dan medium TCBS dengan warna koloni kuning dan hijau. Kemudian dilanjutkan uji biokimia menggunakan KIA, SSS, MIO, Simon citrate dan uji serologi menggunakan antisera polyvalen dan monovalen seperti *Salmonella*, *Shigella*, *V.cholerae*

^{17,28}

Pembuatan reagen koaglutinasi

Disiapkan 10 % suspensi protein A dari sel bakteri *Staphylococcus aureus* produk Sigma Protein A *insoluble* P 7155. Diambil 1 ml sel bakteri dan dimasukkan ke dalam tabung. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Disiapkan juga antisera polyvalen *V.cholerae* ●1 produk difco dan dilakukan hitung titer antisera tersebut dengan cara pengenceran (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/ 128, 1/256, 1/512). Kemudian diambil 200 µl dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi suspensi sel *S.aureus* (proses *coated*). Diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 1 jam . Kemudian dicentrifuge 3500 rpm selama 20 menit, dibuang supernatannya dan ditambahkan PBS sebanyak 3 mL. Disentrifus lagi dan

supernatannya dibuang. Ditambahkan sebanyak 6 mL PBS, kemudian dihomogenkan. Reagen koaglutinasi siap digunakan dan dapat bertahan selama 1 bulan pada suhu 4 °C.^{9,23}

Uji sensitifitas reagen koaglutinasi

Untuk mengetahui limit deteksi *V.cholerae* dibuat suspensi bakteri murni 0,5 MacFarland dengan menggunakan larutan PBS (0,5 Mcfarland setara 10⁸ cfu/ml). Dari suspensi tersebut dibuat pengenceran 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ dalam larutan PBS. Masing – masing pengenceran dilakukan uji koaglutinasi dengan cara :^{9,23}

- Disiapkan gelas alas bersikular.
- Kemudian diambil 1 tetes suspensi bakteri pada masing – masing pengenceran.
- Ditambahkan 1 tetes reagen koaglutinasi
- Dicampur dan dirotasikan selama 2 – 4 menit, kemudian diamati terbentuknya aglutinasi. Dilakukan juga kontrol negatif dengan menggunakan akuades steril

Uji spesifitas reagen koaglutinasi

Uji Spesifitas dilakukan untuk membuktikan bahwa uji koaglutinasi tidak memberikan hasil positif dengan bakteri *E. coli*, *S.typhi*, *Shigella sonnei*, *V.parahaemolyticus*, *S.faecalis*, dan *S.dysenteriae*. Sebagai kontrol positif digunakan biakan *V.cholerae*, sedangkan kontrol negatif digunakan air steril. Disiapkan gelas alas yang bersikular, diberi 1 tetes reagen koaglutinasi, kemudian satu koloni masing – masing bakteri diambil lalu dicampur dan diratakan. Gelas alas digoyangkan selama 2 – 4 menit dan diamati terbentuknya aglutinasi.²³

Prosedur uji strip

Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung lalu strip *Vibrio cholera* O1 dicelupkan ke dalam sampel. Hasil dibaca dengan terbentuknya pita pada strip dalam waktu 5 – 15 menit. Hasil positif bila terbentuk dua pita pada daerah sampel dan kontrol sedangkan hasil negatif terbentuk satu pita pada daerah kontrol.²¹

Pengujian medium pengayaan dengan isolat *V.cholerae* O1

Bakteri *V.cholerae* dari stok dihidupkan kembali dengan cara kultur, isolasi dan identifikasi pada medium selektif, kemudian dibuat suspensi bakteri *V.cholerae* 0,5 MacFarland. Selanjutnya dibuat pengenceran dengan menggunakan *phosphate buffer saline* dari suspensi bakteri tersebut yakni 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 . Dari masing – masing pengenceran diambil 2 ml dan dimasukkan ke tiga medium pengayaan yakni medium air pepton alkali, medium kombinasi air pepton alkali dengan *bismuth sulphite* dan medium *gelatin phosphate salt broth*. Masing – masing biakan dibuat dua seri untuk diinkubasi pada suhu 37°C dan 42°C . Setiap 30 menit dilakukan pengukuran peningkatan jumlah bakteri pada masing – masing medium pengayaan dengan menggunakan alat nefelometer. Pengukuran dengan alat nefelometer dilakukan sampai 16 kali pembacaan setiap 30 menit.

Pengujian medium pengayaan dengan *V.cholerae* + feses normal

Disiapkan feses normal yang telah dibuktikan bebas bakteri enterik patogen. Disiapkan juga suspensi bakteri *V.cholerae* 0,5 MacFarland (setara dengan 10^8 cfu/mL). Kemudian suspensi *V.cholerae* dibuat pengenceran dengan menggunakan *phosphate buffer saline* yakni dari 10^7 - 10^1 CFU/mL. Sebagai bahan pengujian digunakan pengenceran 10^4 - 10^1 CFU/mL dari pengenceran tersebut diambil 2 ml dan dimasukkan ke dua medium pengayaan yakni medium air pepton alkali dan medium *gelatin phosphate salt broth*, kemudian ditambahkan juga 2 gr feses normal. Dibuat 2 seri untuk diinkubasi suhu 37°C dan 42° . Setiap 1 jam dilakukan hitung koloni dengan metode hitung koloni total menggunakan medium TCBS sampai jam ke 8, kemudian dilakukan juga uji diagnosis cepat menggunakan test strip imunokromatografi dan koaglutinasi setiap 1 jam sampai jam ke 8.

f. Analisis dan penyajian data

Analisis statistik menggunakan bantuan program software SPSS 17. Analisis deskriptif disajikan dalam bentuk tabel dan diagram serta narasi. Analisis untuk mengetahui perlakuan atau perbedaan masing – masing kelompok digunakan uji one way anova. Analisis untuk mengetahui sensitifitas digunakan core test.

6. HASIL

a. Optimasi reagen koaglutinasi

Pada awal penelitian ini dilakukan optimasi reagen koaglutinasi karena reagen yang tersedia di dalam kit deteksi *V.cholerae* belum siap pakai.. Penggunaan protein A *S.aureus* yang telah dicoated antisera polyvalen *V.cholera* O1 harus terlebih dahulu dioptimasi untuk mengetahui sensitifitas dan spesifitas reagensia yang akan digunakan.

Pengukuran titer antisera polyvalen *V.cholerae* O1

Pengukuran titer antisera polivalen *V.cholerae* O1 dilakukan untuk mengetahui konsentrasi antisera yang akan digunakan untuk pelapisan (*coated*) Protein A sel bakteri *S.aureus*, sehingga diharapkan pengenceran antisera yang digunakan adalah pengenceran dengan titer yang tinggi

Tabel 1. Hasil uji titer antisera *Vibrio cholerae* O1 polivalen

Pengenceran	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Antisera Polivalen									
<i>V.cholerae</i> O1	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Keterangan : - : negatif aglutinasi, + : positif aglutinasi

Hasil pada tabel 2 menunjukkan titer pengenceran tertinggi adalah 1/128. Konsentrasi ini sudah mencukupi untuk digunakan sebagai persiapan pembuatan reagen koaglutinasi. Umumnya antisera *V.cholerae* O1 yang melapisi protein A sel *S.aureus* merupakan hasil yang didapat dari imunisasi kelinci. Namun pada penelitian ini menggunakan antisera polivalen *V.cholerae* O1 produk Difco yang dibeli secara komersial karena lebih efisien dan mudah didapat.

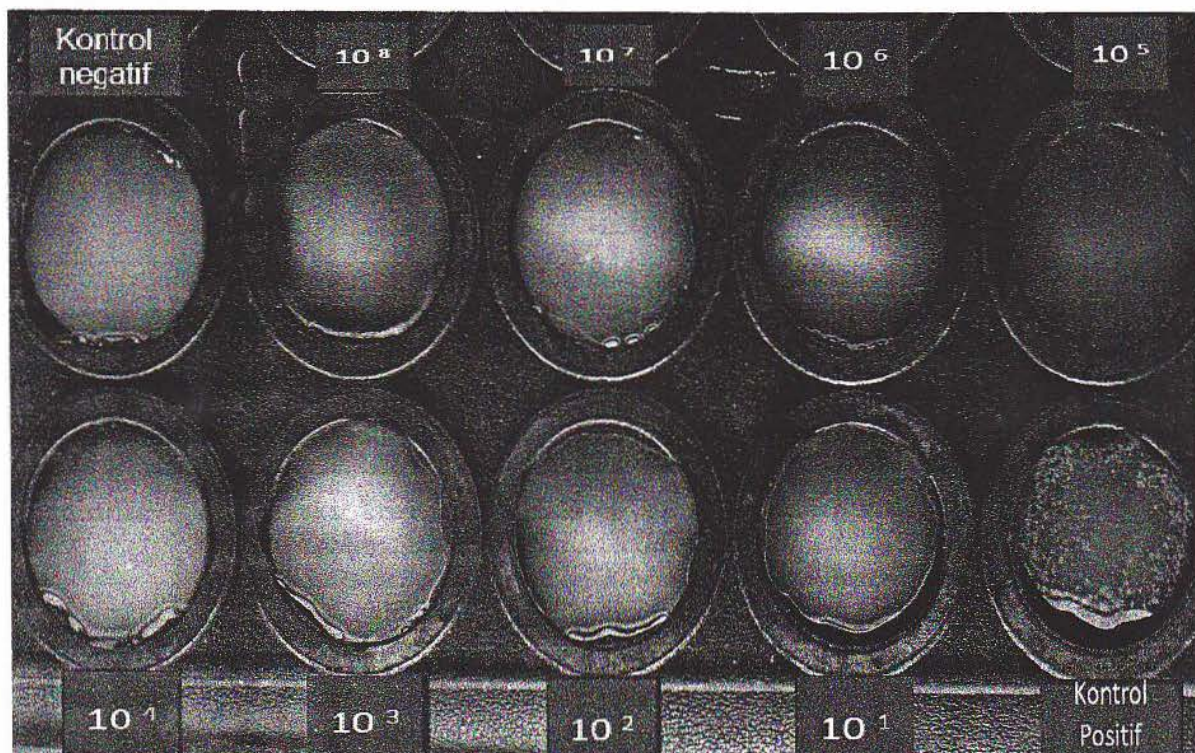
Limit deteksi uji koaglutinasi

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi bakteri *Vibrio cholera* O1 terendah yang masih dapat terdeteksi dengan metode koaglutinasi dengan memperlihatkan adanya aglutinasi secara makroskopik. Batas limit deteksi *V.cholerae* O1 pada penelitian ini adalah $>10^8$ CFU/mL secara makroskopik. Sementara pengenceran 10^7 dan 10^6 CFU/mL adanya aglutinasi hanya dapat dilihat secara mikroskopik, diperlihatkan pada tabel 3 dan gambar 5.

Tabel 2. Limit deteksi uji koaglutinasi *V.cholerae* O1 secara makroskopik dan mikroskopik

Pengenceran sel bakteri								
<i>V.cholerae</i> O1	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
Pembacaan makroskopik	+	-	-	-	-	-	-	-
Pembacaan mikroskopik	+	+	+	-	-	-	-	-

Keterangan : - : koaglutinasi negatif, + : koaglutinasi positif



Gambar 1. Limit deteksi uji koaglutinasi *V.cholerae* O1, reaksi koaglutinasi dengan berbagai sampel pengenceran (10^8 - 10^1), kontrol negatif menggunakan NaCl fisiologis, kontrol positif menggunakan koloni *V.cholerae* O1

Uji spesifitas reagen koaglutinasi

Uji spesifitas reagen koaglutinasi dilakukan terhadap bakteri patogen enterik penyebab diare yaitu *Escherichiae coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*. Sebagai kontrol positif pada uji spesifitas ini digunakan isolat *Vibrio cholerae* O1.

Hasil uji spesifitas menunjukkan reaksi positif aglutinasi hanya pada *V.cholerae* O1, sementara bakteri lainnya menunjukkan hasil negatif. (Gambar 6)



Gambar 2. Hasil reaksi koaglutinasi pada uji spesifitas reagen koaglutinasi terhadap bakteri *Escherichiae coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* O1 . Reaksi aglutinasi positif hanya pada *V.cholerae* O1, sementara bakteri lainnya menunjukkan hasil aglutinasi negatif

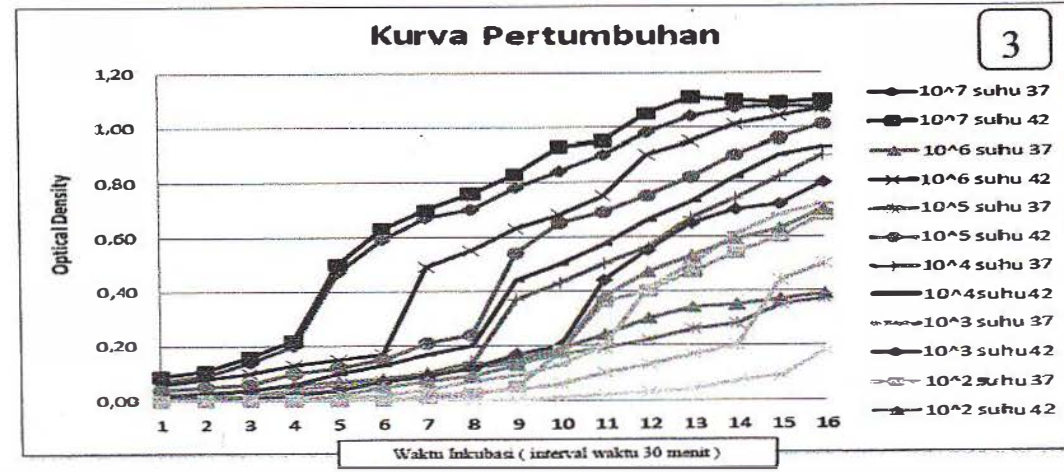
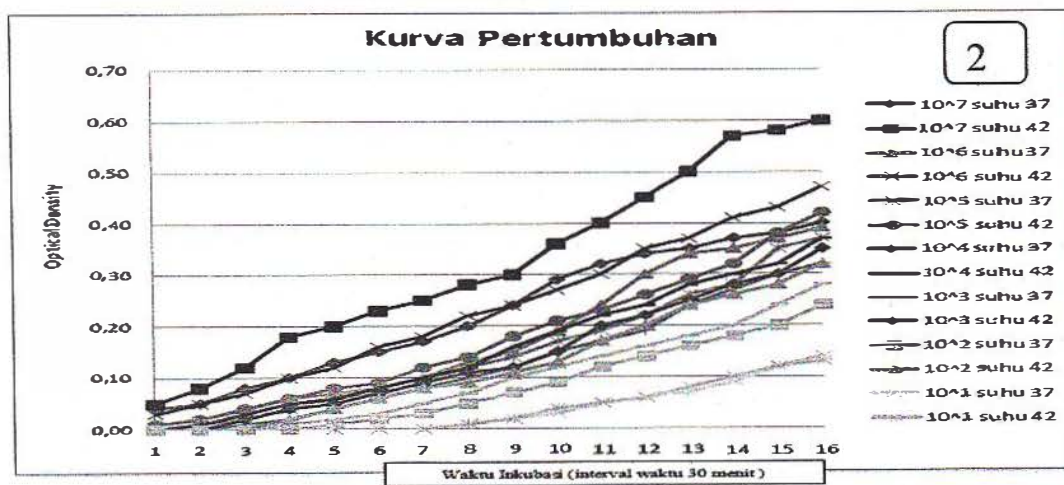
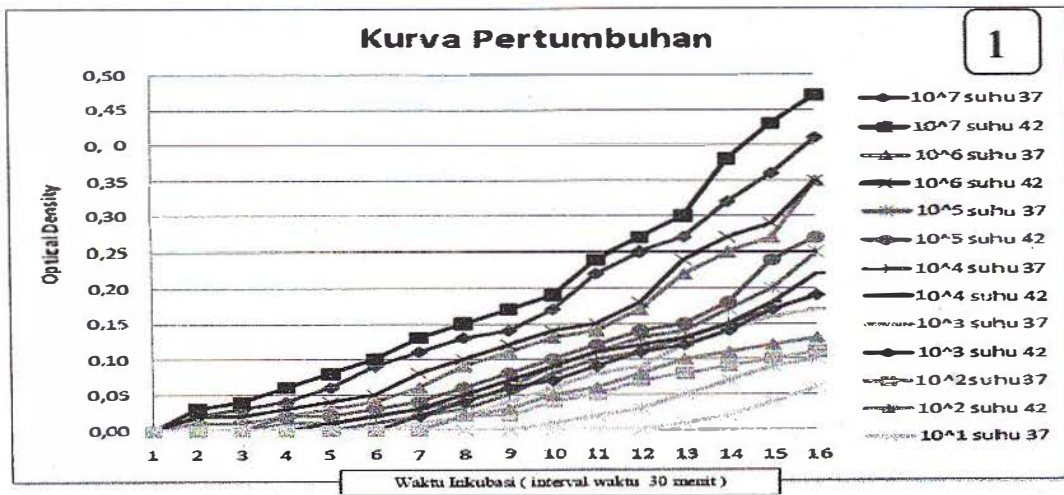
b. Hasil uji medium pengayaan dengan bakteri *V.cholerae* O1

Pengujian medium pengayaan yang terdiri dari medium *bismuth sulphite*, medium *gelatin phosphate salt broth* dan medium air pepton alkali bertujuan untuk melihat kecepatan pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* O1 pada medium pengayaan tersebut dan melihat pengaruh perlakuan suhu inkubasi 37°C dan 42°C terhadap pertumbuhan bakteri. Sementara inokulasi suspensi serial bakteri $10^7 - 10^1$ CFU/mL bertujuan untuk memberikan gambaran kondisi jumlah sel *Vibrio cholera* di dalam feses yang dapat diperbanyak dengan ketiga medium pengayaan pada penderita kolera ringan, sedang dan berat.³³

Pengujian medium pengayaan dilakukan dengan menginokulasikan serial pengenceran suspensi bakteri *Vibrio cholerae* O1 ke dalam tiga macam medium pengayaan, diinkubasi pada suhu 37° C dan 42° C, kemudian setiap 30 menit dilakukan pengukuran konsentrasi bakteri sampai 16 kali.

Pada gambar 7 Pengujian medium pengayaan bismuth sulfit dengan menggunakan bakteri *V.cholerae* O1 terlihat adanya kurva peningkatan konsentrasi pertumbuhan kekeruhan untuk masing – masing serial pengenceran. Peningkatan konsentrasi ini setiap 30 menit diamati selama 16 kali. Perlakuan inkubasi pada suhu 37°C dan 42°C juga terlihat mempengaruhi perbedaan konsentrasi pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* O1. Secara statistik rata – rata pertumbuhan bakteri di medium bismuth sulfit suhu 37° C adalah 0,086 dan pertumbuhan pada suhu 42° C adalah 0,098. Kecepatan pertumbuhan bakteri ditandai dengan peningkatan kekeruhan (nilai absorben) yang diukur dengan menggunakan densitometer pada panjang gelombang 580 nm.

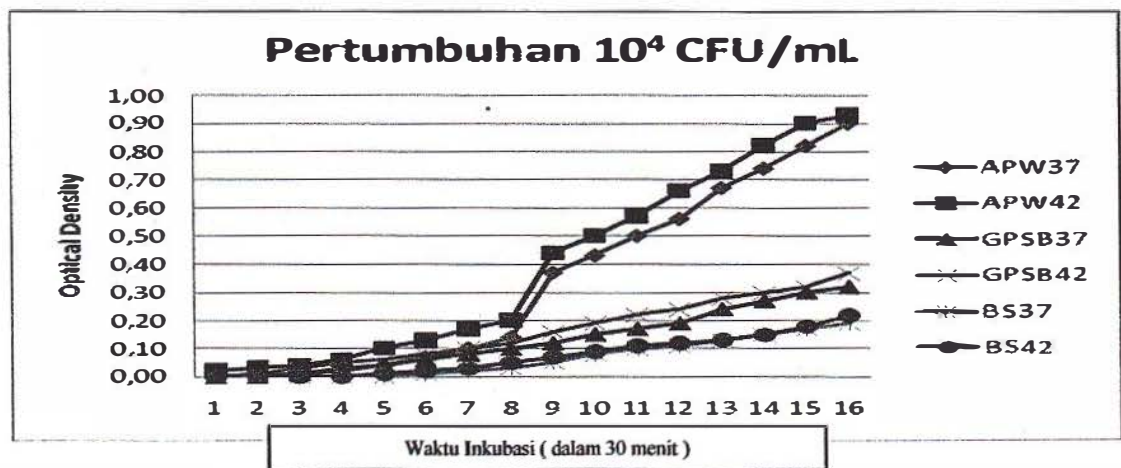
Pertumbuhan *Vibrio* lainnya yang digunakan adalah *Gelatin Phosphate Salt Broth*. Peningkatan pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 di tiap serial pengenceran terlihat pada gambar 7. Pengaruh perbedaan suhu terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* O1 juga terlihat dari jam pertama sampai jam berikutnya untuk masing–masing serial pengenceran. Pada akhir pembacaan setiap serial dilakukan pemeriksaan kultur secara konvensional. Peningkatan konsentrasi ini setiap 30 menit juga diamati selama 16 kali dan secara statistik rata – rata pertumbuhan bakteri di medium *Gelatin Phosphate Salth Broth* pada suhu 37° C adalah 0,144 dan pertumbuhan pada suhu 42° C adalah 0,192.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada medium pengayaan 1. *Bismuth sulphite*, 2. *Gelatin phosphate salt broth*, 3. Air pepton water pada suhu 37°C dan 42°C berdasarkan pengukuran optical density (●D) pada panjang gelombang 580 nm.

Medium pengayaan berikutnya yang digunakan sebagai medium pertumbuhan *Vibrio* adalah air pepton alkali. Medium ini sering digunakan di laboratorium sebagai medium perbanyakan bakteri *Vibrio*. Pada gambar 7 terlihat pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 yang ditandai dengan peningkatan nilai konsentrasi OD pada tiap serial pengenceran. Perbedaan suhu inkubasi 37°C dan 42°C juga terlihat sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Secara statistik rata – rata pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 di medium air pepton alkali pada suhu 37°C adalah 0,394 dan pertumbuhan pada suhu 42°C adalah 0,438.

Untuk melihat perbedaan pertumbuhan *V.cholerae* O1 diantara ketiga jenis medium pengayaan, maka diambil data pertumbuhan dari serial pengenceran 10⁴ CFU/mL *V.cholerae* O1.

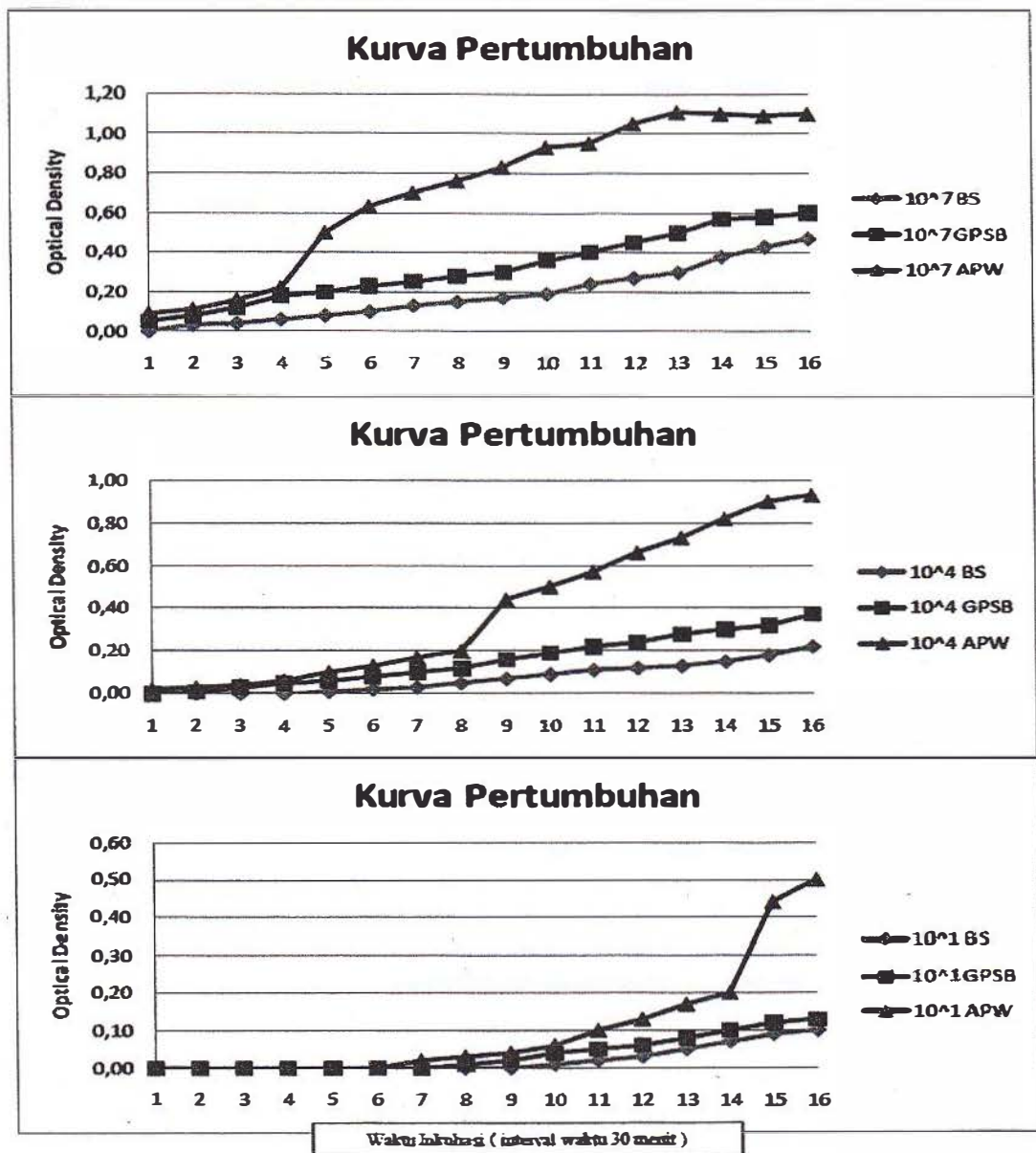


Gambar 4. Kurva pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1. Sebanyak 10⁴ CFU/mL bakteri *V.cholerae* O1 diinokulasikan pada medium BS (bismuth sulphite), GPSB (gelatine phosphate salt broth), dan APW (alkali pepton water) dan diinkubasi pada suhu 42°C dan 37° C.

Pada gambar 8 terlihat perbedaan pertumbuhan *V.cholerae* O1. Bakteri dengan jumlah 10⁴ CFU/mL diinokulasikan ke medium pengayaan, kemudian diinkubasi pada suhu 42°C dan 37° C. Dari kurva pertumbuhan terlihat medium air pepton alkali dapat meningkatkan pertumbuhan lebih cepat dibandingkan medium lainnya.

Dari hasil uji medium tersebut terlihat variasi perbedaan pertumbuhan *V.cholerae* O1 ($P < 0,01$) dimana pertumbuhan lebih meningkat cepat pada suhu 42 ° C. Nilai rata – rata pertumbuhan pada suhu 42°C lebih tinggi dibandingkan pada suhu 37°C. Sementara untuk melihat perbedaan medium pengayaan *bismuth sulphite*, *gelatin phosphate salt broth* dan air pepton alkali pada suhu 42° C terhadap pertumbuhan *V.cholerae* O1, maka digunakan

data serial pengenceran dengan jumlah bakteri 10^7 , 10^4 dan 10^1 CFU/mL pada tiap medium pengayaan.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1, sebanyak 10^7 , 10^4 dan 10^1 CFU/mL bakteri *V.cholerae* O1 diinokulasikan pada medium BS (*bismuth sulphite*), GPSB (*gelatine phosphate salt broth*), dan APW (*alkali pepton water*) dan diinkubasi pada suhu 42°C .

Dari kurva pertumbuhan gambar 9 terlihat medium pengayaan air pepton alkali mempunyai kemampuan dalam meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada suhu 42°C lebih cepat dibandingkan dengan medium pengayaan lainnya dengan nilai rata – rata

pertumbuhannya adalah 0,438 untuk air pepton alkali, diikuti oleh medium gelatin phosphate salt broth 0,192 dan medium *bismuth sulphite* 0,098.

c. Hasil biakan feses orang sehat

Tabel 3. Hasil biakan feses orang sehat

No	Jenis bakteri	Hasil
1	<i>E.coli</i> non patogen	Positif
2	<i>E.coli</i> patogen O 157	Tidak tidak ditemukan
3	<i>Salmonella</i>	Tidak tidak ditemukan
4	<i>Shigella</i>	Tidak tidak ditemukan
5	<i>V.cholerae</i>	Tidak tidak ditemukan
6	<i>V.parahaemolyticus</i>	Tidak tidak ditemukan

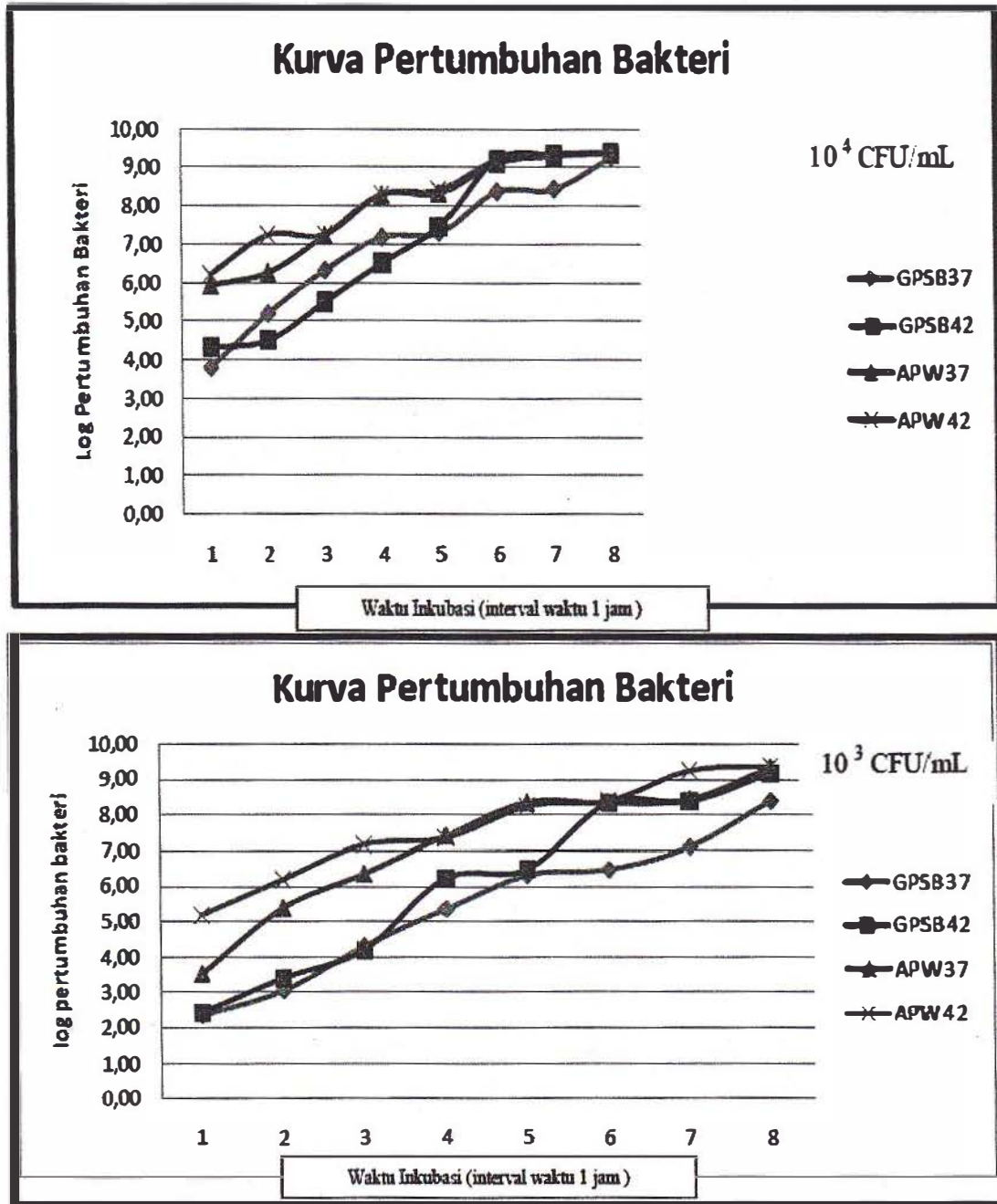
Pada tabel 4 menunjukkan biakan bakteri dengan hasil tidak ditemukan bakteri patogen pada feses orang sehat dan hanya ditemukan bakteri *E.coli* non patogen saja yang ditemukan.

d. Hasil uji medium pengayaan dengan isolat *V.cholerae* O1 + feses orang sehat.

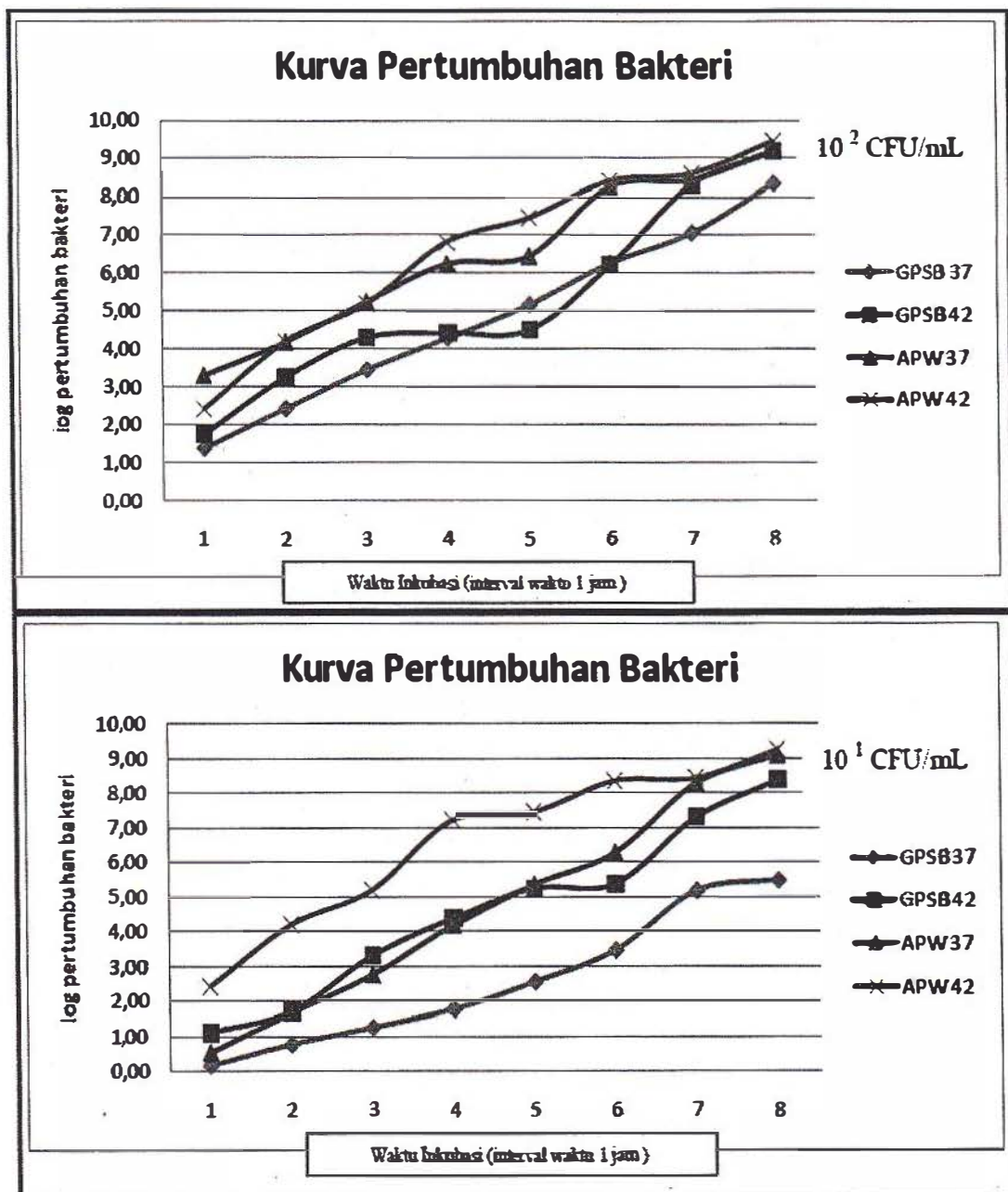
Pada pengujian sebelumnya medium *bismuth sulphite* menunjukkan pertumbuhan bakteri yang lamban dibandingkan pada medium *gelatine phosphate salt broth* dan air peptone alkali, sehingga pengujian selanjutnya hanya menggunakan dua medium yakni *gelatin phosphate salt broth* dan air pepton alkali. Pengujian medium ini bertujuan untuk melihat kemampuan medium pengayaan *gelatin phosphate salt broth* dan air pepton alkali dalam meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae* dengan penambahan feses orang sehat sebanyak 2 gr ke dalam 16 mL medium. Pada pengujian medium, selain menggunakan serial pengenceran *V.cholerae* O1 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL yang diinokulasikan ke medium pengayaan, juga ditambahkan 2 gr feses untuk menciptakan kondisi spesimen penderita kolera sebenarnya.¹³ Kemudian diinkubasi pada suhu 37° C dan 42° C. Peningkatan jumlah bakteri *V.cholerae* O1 dihitung dengan metode hitung koloni cawan petri setiap satu jam sekali selama 8 jam. Saat bersamaan tiap jam juga dilakukan deteksi antigen *V.cholerae* O1 metode uji strip dan koaglutinasi.

Pertumbuhan *V.cholerae* O1 dengan jumlah bakteri 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL + 2 gr feses normal dan diinokulasikan ke tiap medium pengayaan serta diinkubasi pada suhu 37°C dan 42°C tampak gambar 10. Kurva tersebut menunjukkan perbedaan pertumbuhan pada tiap medium pengayaan. Secara statistik ada perbedaan pertumbuhan pada tiap

medium ($P < 0,01$). Rata – rata nilai pertumbuhan untuk medium APW adalah 7,229 dan 6,569 masing – masing pada suhu 42°C dan 37°C .Untuk medium GPSB 5,729 dan 4,937 masing – masing pada suhu 42°C dan 37°C. Dari data ini terlihat bahwa nilai rata – rata pertumbuhan APW suhu 42°C lebih baik dibandingkan medium GPSB.



Gambar 6. Kurva pertumbuhan bakteri. Sebanyak 10⁴ dan 10³ CFU/mL bakteri *V.cholerae* O1 diinokulasikan pada medium GPSB (*gelatine phosphate salt broth*), dan APW (*alkali pepton water*) dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 42°C.



Gambar 7. Kurva pertumbuhan bakteri. Sebanyak 10² dan 10¹ CFU/mL bakteri *V.cholerae* O1 diinokulasikan pada medium GPSB (*gelatine phosphate salth broth*), dan APW (*alkali pepton water*) dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 42°C.

Pengujian medium pengayaan untuk meningkatkan uji diagnosis cepat

Dalam waktu bersamaan pengujian lebih lanjut dilakukan untuk melihat peningkatan sensitifitas uji diagnosis cepat menggunakan medium pengayaan dengan menginokulasikan

bakteri *V.cholerae* O1 dan 2 gr feses orang sehat, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan 42°C. Pada setiap jam selama masa inkubasi uji strip dan koaglutinasi.

Tabel 4. Uji kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^4 CFU/mL dalam meningkatkan sensitifitas deteksi *V.cholerae* O1 menggunakan Uji Diagnosis Cepat.

Waktu Inkubasi	GPSB				APW			
	37 °C		42 °C		37 °C		42 °C	
	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2
Jam ke 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 4	-	-	-	-	-	+	-	+
Jam ke 5	-	-	-	-	+	+	+	+
Jam ke 6	+	+	+	+	+	+	+	+
Jam ke 7	+	+	+	+	+	+	+	+
Jam ke 8	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan :GPSB: *gelatin phosphate salt broth*, APW: *alkalin pepton water*, UDC 1(uji diagnosis cepat) : uji strip, - : negatif (terbentuk 1 garis pita) , + : positif (terbentuk 2 garis pita). UDC 2 : uji koaglutinasi, - : negatif aglutinasi, + : positif aglutinasi.

Pada tabel 4 Pengujian metode koaglutinasi menggunakan jumlah awal *V.cholerae* O1 10^4 CFU/mL mulai menunjukkan hasil positif pada jam ke 4 bila dikultur pada medium APW suhu inkubasi 37° C dan 42° C dengan peningkatan jumlah bakteri $1,9 \times 10^8$ dan $1,9 \times 10^8$ CFU/mL Sedangkan pengujian yang sama pada uji strip menunjukkan hasil positif pada jam ke 5 dengan peningkatan jumlah bakteri $2,1 \times 10^8$ dan $2,6 \times 10^8$ CFU/mL. Pemiakan bakteri pada medium GPSB dengan suhu inkubasi 37° C dan 42° C memberikan hasil positif uji koaglutinasi dan uji strip pada jam ke 6 dengan peningkatan jumlah bakteri suhu 37 dan 42 adalah $2,3 \times 10^8$ dan $1,5 \times 10^9$. Peningkatan jumlah bakteri tiap jam dapat dilihat pada lampiran.

Pada tabel 5 pengujian metode koaglutinasi menggunakan jumlah awal *V.cholerae* O1 10^3 CFU/mL mulai menunjukkan hasil positif pada jam ke 5 bila dikultur pada medium APW suhu inkubasi 37° C dan 42° C. Sedangkan pengujian yang sama pada uji strip menunjukkan hasil positif pada jam ke 6. Pemiakan bakteri pada medium GPSB dengan suhu inkubasi 37°C memberikan hasil positif uji koaglutinasi dan uji strip pada jam ke 8. Sedangkan pada medium GPSB suhu 42°C hasil koaglutinasi mulai menunjukkan hasil positif pada jam ke 6 dan hasil uji strip mulai menunjukkan hasil positif pada jam ke 7. Peningkatan jumlah bakteri tiap jam dapat dilihat pada lampiran.

Tabel 5. Uji kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^3 CFU/mL dalam meningkatkan sensitifitas deteksi *V.cholerae* O1 menggunakan Uji Diagnosis Cepat.

Waktu Inkubasi	GPSB				APW			
	37 ° C		42 ° C		37 ° C		42 ° C	
	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2
Jam ke 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 4	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 5	-	-	-	-	-	+	-	+
Jam ke 6	-	-	-	+	+	+	+	+
Jam ke 7	-	-	+	+	+	+	+	+
Jam ke 8	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan :GPSB: *gelatin phosphate salt broth*, APW: *alkalin pepton water*, UDC 1(uji diagnosis cepat) : uji strip, - : negatif (terbentuk 1 garis pita) , + : positif (terbentuk 2 garis pita). UDC 2 : uji koaglutinasi, - : negatif aglutinasi, + : positif aglutinasi.

Tabel 6. Uji kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^2 CFU/mL dalam meningkatkan sensitifitas deteksi *V.cholerae* O1 menggunakan Uji Diagnosis Cepat.

Waktu Inkubasi	GPSB				APW			
	37 ° C		42 ° C		37 ° C		42 ° C	
	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2
Jam ke 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 4	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 5	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 6	-	-	-	-	-	+	+	+
Jam ke 7	-	-	+	+	+	+	+	+
Jam ke 8	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan :GPSB: *gelatin phosphate salt broth*, APW: *alkalin pepton water*, UDC 1(uji diagnosis cepat) : uji strip, - : negatif (terbentuk 1 garis pita) , + : positif (terbentuk 2 garis pita). UDC 2 : uji koaglutinasi, - : negatif aglutinasi, + : positif aglutinasi.

Selanjutnya pada tabel 6 pengujian diagnosis cepat koaglutinasi dengan jumlah *V.cholerae* O1 awal 10^2 CFU/mL di dalam medium APW, hasil positif timbul pada jam ke 6, kecuali pada uji strip dengan suhu inkubasi 37°C , menunjukkan hasil positif jam ke 7. Sementara itu bila digunakan medium pengayaan GPSB, kedua uji cepat memberikan hasil positif pada jam ke-8 bila inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dan jam ke-7 bila pada suhu 42°C. Peningkatan jumlah bakteri tiap jam dapat dilihat pada lampiran.

Tabel 7. Uji kemampuan medium pengayaan dengan jumlah bakteri awal 10^1 CFU/mL dalam meningkatkan sensitifitas deteksi *V.cholerae* O1 menggunakan Uji Diagnosis Cepat.

Waktu Inkubasi	GPSB				APW			
	37 °C		42 °C		37 °C		42 °C	
	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2	UDC 1	UDC 2
Jam ke 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 4	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 5	-	-	-	-	-	-	-	-
Jam ke 6	-	-	-	-	-	-	-	+
Jam ke 7	-	-	-	-	-	+	+	+
Jam ke 8	-	-	+	+	+	+	+	+

Keterangan :GPSB: *gelatin phosphate salt broth*, APW: *alkalin pepton water*, UDC 1(uji diagnosis cepat) : uji strip, - : negatif (terbentuk 1 garis pita), + : positif (terbentuk 2 garis pita). UDC 2 : uji koaglutinasi, - : negatif aglutinasi, + : positif aglutinasi.

Sementara itu pada tabel 7 dengan jumlah *V.cholerae* O1 awal 10^1 CFU/mL pada medium APW dengan suhu inkubasi 42° C uji koaglutinasi menunjukkan hasil positif pada jam ke 6 dan uji strip pada jam ke 7. Bila suhu inkubasi yang digunakan 37°C maka uji koaglutinasi positif pada jam ke 7 sedangkan uji strip jam ke 8.. Bila digunakan medium GPSB dengan inkubasi pada suhu 42° C, maka kedua jenis uji menunjukkan hasil positif pada jam ke 8., sedangkan pada suhu 37° C tidak didapatkan hasil positif sampai akhir pengujian (jam ke 8). Peningkatan jumlah bakteri tiap jam dapat dilihat pada lampiran.

7. PEMBAHASAN

Kejadian luar biasa kolera merupakan kasus yang harus diketahui dan ditangani dengan segera agar tidak menyebar ke lingkungannya. Selain itu temuan sumber yang cepat sangat diperlukan untuk pencegahan penyebaran kolera ke daerah lain.. Pada saat ini metode kultur bakteri *Vibrio cholerae* yang digunakan pada keadaan kejadian luar biasa memerlukan waktu yang cukup lama, kelengkapan fasilitas dan tenaga yang terlatih, sehingga sangat diperlukan uji cepat yang sensitif dan spesifik. Penelitian ini dilakukan untuk meningkatkan sensitifitas uji cepat koaglutinasi dan strip immunokromatografi dengan terlebih dahulu menginokulasi spesimen feses ke dalam medium pengayaan. Dengan demikian diharapkan dapat dipilih metode deteksi yang mudah dan cepat untuk meningkatkan temuan kasus kejadian luar biasa kolera.

Pada proses persiapan pembuatan reagen koaglutinasi, antisera *V.cholerae* O1 yang didapat secara komersial mempunyai titer pengenceran 1/128. Menurut *Rahman et.al* titer pengenceran ini sudah dapat untuk melapisi protein A sel *Staphylococcus aureus* yang juga didapat secara komersial. Penggunaan antisera untuk keperluan persiapan reagen koaglutinasi adalah antara titer 1/4 sampai dengan titer 1/64. Namun titer antisera > 1/16 sering digunakan untuk keperluan diagnostik pengujian antigen atau toksin, yang diantaranya untuk deteksi enterotoksin *Salmonella* dan antigen *Brucella*.²⁹ Metode koaglutinasi untuk deteksi *V.cholerae* yang dilakukan oleh *Mahbubur Rahman et al* menggunakan antisera polivalen hasil imunisasi kelinci dan dengan konsentrasi titer yang sangat tinggi (1:3200).⁹

Pada pengujian metode koaglutinasi ini jumlah minimal bakteri *V.cholerae* O1 yang terdeteksi secara makroskopik adalah 10^8 CFU/mL, sedangkan secara mikroskopik 10^6 CFU/mL. Pada penerapannya di lapangan, pembacaan diagnosis cepat metode koaglutinasi dilakukan secara visual. Pada penelitian *Mahbubur Rahman et al* uji koaglutinasi terhadap *Vibrio cholerae* memberi hasil positif apabila jumlah sel bakteri adalah $> 1,5 \times 10^7$ CFU/mL.⁹ Sebaliknya *JB Kaper* dalam reviewnya menyebutkan bahwa sensitifitas uji koaglutinasi *V.cholerae* hampir mendekati teknik kultur. Dalam evaluasinya terhadap spesimen feses sukarelawan yang terinfeksi *V.cholerae* menunjukkan sensitifitas uji koaglutinasi adalah 82% terhadap feses yang mengandung *V.cholerae* $< 10^4$ CFU/mL dan sebesar 89% untuk feses yang mengandung *V.cholerae* $> 10^4$ CFU/mL.²⁶

Pada pengujian spesifitas reagen koaglutinasi dilakukan dengan cara mencampurkan reagen dengan beberapa jenis bakteri enterik, yaitu *Escherichiae coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae O1*, memberikan hasil, reaksi aglutinasi positif hanya pada *V.cholerae O1*. Hal ini menunjukkan bahwa uji koaglutinasi tidak memberikan reaksi silang dengan bakteri-bakteri tersebut.

Pengujian spesifitas reagen koaglutinasi pada beberapa penelitian seperti yang dilakukan oleh *Mahbubur Rahman et al* menggunakan sampel klinik feses penderita diare yang diinkubasi terlebih dahulu pada medium pengayaan selama 4 jam menunjukkan spesifitas 98,7%.⁹ Pada penelitian ini hasil pengujian sensitifitas dan spesifitas reagen koaglutinasi dilakukan dengan menggunakan spesimen serial pengenceran dan isolat bakteri patogen enterik. Sehingga perlu dilakukan pengujian lagi menggunakan sampel feses klinik dari penderita diare kolera.

Hasil pengujian medium pengayaan dengan menggunakan bakteri *V.cholerae O1* dengan serial pengenceran jumlah bakteri $10^7 - 10^1$ CFU/mL menunjukkan variasi pertumbuhan yang berbeda pada suhu 37°C dan 42°C ($P < 0,01$). Pertumbuhan pada medium dengan inkubasi suhu 42°C menunjukkan kurva pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan suhu 37°C (Tabel 8). Sementara secara statistik nilai rata-rata pertumbuhan bakteri pada medium air pepton alkali suhu 42°C lebih baik dibandingkan medium bismuth sulphite dan *gelatin phosphate salt broth* suhu 37°C dan 42°C. Analisis statistik lebih lanjut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan pertumbuhan *V.cholerae* di medium air pepton alkali pada suhu 37°C dan 42°C. Penelitian yang dilakukan untuk membedakan pertumbuhan *V.cholerae* pada suhu 35°C dan 42°C dilakukan oleh *Angelo Depaola et al* menggunakan spesimen *Oysters* yang mengandung *V.cholerae* dan hasil menunjukkan pertumbuhan lebih baik pada suhu 42°C dibandingkan dengan suhu 35°C ($P < 0,01$) dalam medium pengayaan air pepton alkali³⁰. Dalam penelitiannya juga disebutkan pertumbuhan pada suhu 42°C dapat membedakan *Vibrio cholerae* dengan bakteri spesies lainnya dan dapat meningkatkan spesifitas dengan menghambat pertumbuhan mikroflora lainnya.³⁰ Pada penelitian lainnya yang dilakukan oleh *Sechter et al* tentang pengaruh suhu menyebutkan pertumbuhan *V.cholera El Tor* dalam jumlah kecil pada air limbah dapat ditingkatkan lebih baik pada medium pengayaan air pepton alkali pada suhu inkubasi 42°C daripada suhu 37°C, sebaliknya *V.cholera Classic* tumbuhan lebih baik pada suhu 37°C daripada suhu 42°C.³¹

Tabel 8. Nilai rata – rata pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 pada ketiga medium pengayaan

	MEDIUM					
	BS		GPSB		APW	
	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
Nilai rata - rata Pertumbuhan dalam OD	0,864	0,098	0,144	0,192	0,394	0,438

Pada pengujian lebih lanjut, ke dalam medium pengayaan air pepton alkali dan *gelatin phosphate salt broth* diinokulasikan bakteri murni dengan serial pengenceran 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL kemudian ditambahkan feses normal 2 gr. Serial pengenceran ini dilakukan untuk mempermudah pengamatan pertumbuhan bakteri dengan cara hitung koloni. Secara statistik hasil pertumbuhan menunjukkan ada perbedaan diantara medium pengayaan yang digunakan dalam penelitian ini ($P < 0,01$) dengan nilai rata – rata pertumbuhan pada medium APW suhu 42°C lebih baik dibandingkan medium lainnya (Tabel 9). Pada penelitian *Angelo Depaola et al* untuk meningkatkan pertumbuhan *V.cholerae* dalam waktu 6 – 8 jam juga digunakan air pepton alkali, yaitu medium yang sering digunakan di Amerika Serikat. Peneliti tersebut merekomendasikan penggunaan *gelatin phosphate salth broth* sebagai alternatif air pepton alkali untuk pertumbuhan *V.cholerae* tanpa menyebutkan alasannya.³⁰

Tabel 9. Nilai rata – rata pertumbuhan bakteri *V.cholerae* O1 pada dua medium pengayaan

	MEDIUM			
	GPSB		APW	
	37°C	42°C	37°C	42°C
Nilai rata – rata Pertumbuhan log 10	4,937	5,729	6,569	7,229

Pada saat yang bersamaan uji diagnosis cepat metode strip (*Crystal VC*) dan koaglutinasi juga dilakukan untuk mendeteksi *V.cholerae* pada tiap medium. Pada uji deteksi *V.cholerae* metode strip dengan konsentrasi awal inokulasi 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL menunjukkan hasil strip mulai positif pada medium pengayaan APW suhu 42°C dan 37°C yang kemudian diikuti pada medium GPSB suhu 42°C dan 37°C . Dari hasil pengujian dengan uji strip menunjukkan penggunaan medium pengayaan APW suhu 37 dan 42 untuk meningkatkan sensitifitas uji strip tidak jauh berbeda tapi lebih baik dibandingkan pada medium GPSB suhu 42°C dan 37°C .

Pada pengujian dengan uji strip batas limit yang terdeteksi baik pada medium GPSB maupun medium APW suhu 37°C dan 42°C adalah $> 2,0 \times 10^8$ CFU/mL. Pada penelitian yang dilakukan Piyali Mukherjee et al didapatkan limit deteksi bakteri *V.cholerae* O1 menggunakan uji strip *Crystal VC* adalah 10^6 CFU/mL.³² Limit deteksi yang sama juga didapatkan oleh peneliti Rohani MY et al ketika menggunakan uji strip produk dari *Malaysian Bio-Diagnostics Research (MBDr)*¹³ Pada penelitian ini, uji dilakukan dengan melakukan serial pengenceran 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL bakteri *V.cholerae* dan penambahan feses orang sehat sebanyak 2 gr. Limit deteksi yang diperoleh pada penelitian ini adalah $> 2,0 \times 10^8$ CFU/mL. Perbedaan ini mungkin terjadi akibat adanya faktor inhibisi yang terdapat pada feses.

Pada pengujian dengan uji koaglutinasi batas limit yang terdeteksi baik pada medium GPSB maupun medium APW suhu 37°C dan 42°C adalah $> 1,8 \times 10^8$ CFU/mL. Sementara hasil deteksi limit menggunakan serial pengenceran pada penelitian ini adalah $> 10^8$. Penelitian untuk deteksi *V.cholerae* O1 dengan metode koaglutinasi pada medium pengayaan *bile peptone broth* juga dilakukan oleh Mahbubur Rahman et al dengan hasil koaglutinasi positif apabila jumlah bakteri $> 1,5 \times 10^7$ CFU/mL.⁹ Pada pengujian koaglutinasi menggunakan spesimen feses, *V.cholerae* O1 dengan konsentrasi jumlah bakteri 10^4 CFU/mL dapat terdeteksi ketika diinokulasikan pada medium pengayaan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam.¹¹ Hal ini menunjukkan kesesuaian hasil yang dilakukan penulis yakni sebanyak 10^4 CFU/mL *V.cholerae* O1 diinokulasikan ke medium APW dan ditambah feses normal 2 gr. Hasil mulai menunjukkan koaglutinasi positif setelah inkubasi selama 4 jam.

Hasil pengujian medium pengayaan untuk meningkatkan sensitifitas uji strip dan koaglutinasi menunjukkan metode koaglutinasi lebih cepat mendeteksi positif *V.cholerae* O1 pada medium pengayaan daripada metode strip. Hasil ini berbeda dengan hasil didapatkan Piyali Mukherjee et al bahwa sensitifitas produk strip *Crystal VC* adalah 10^6 CFU/mL.³² Namun oleh penulis saat produk strip diujikan dengan sampel feses 10%, maka uji strip hanya mampu mendeteksi *V.cholerae* O1 bila konsentrasi bakteri telah mencapai $> 10^8$ CFU/mL. Perbedaan ini terjadi karena faktor inhibisi yang belum diketahui yang terdapat pada feses.

Uji strip dan koaglutinasi dengan serial pengenceran *V.cholerae* O1 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL yang diinokulasikan pada medium air pepton alkali dan *gelatin phosphate*

salt broth dengan penambahan 2 gr feses orang sehat menunjukkan bahwa deteksi menggunakan uji koaglutinasi lebih cepat dibandingkan dengan uji strip.

8. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Medium pengayaan dapat digunakan untuk meningkatkan sensitifitas deteksi *V.cholerae* O1 metode strip dan koaglutinasi.
2. Inokulasi bakteri *V.cholerae* O1 pada medium pengayaan menunjukkan kecepatan pertumbuhan yang berbeda ($P<0,01$), rata – rata pertumbuhan *Vibrio cholerae* O1 pada medium air pepton alkali suhu 42°C lebih cepat dibandingkan inkubasi pada suhu 37°C, medium *bismuth sulphite* dan *gelatin phosphate salt broth*.
3. Inokulasi bakteri *V.cholerae* O1 dan penambahan 2 gr feses pada medium air pepton alkali dan *gelatin phosphate salt broth* secara statistik menunjukkan perbedaan ($P<0,01$), nilai rata – rata pertumbuhan air pepton alkali suhu 42°C lebih baik dibandingkan medium *gelatin phosphate salt broth*.
4. Pengujian medium pengayaan untuk meningkatkan sensitifitas uji strip dan koaglutinasi menunjukkan metode koaglutinasi lebih cepat memberikan hasil positif *V.cholerae* O1 daripada metode strip.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk penyempurnaan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan antara lain :

1. Perlu dilakukan penelitian untuk mencari faktor inhibisi uji strip dan koaglutinasi yang terdapat pada sampel feses.
2. Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sampel klinis yang didapat dari lapangan tempat kejadian kolera untuk mendapatkan sensitifitas dan spesifitas uji strip dan koaglutinasi

9. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya ucapkan kepada;

1. Dr.dr.Trihono M,Sc. (Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan) Kemenkes RI.
2. Drs.Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt. (Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan) Kemenkes RI.
3. DR.drg.Magdarina Destri Agtini, MSc. (Ketua PPI PBTDK)
4. Dr.Krisna nur Andriana Pangesti,MS,(Kasub Bidang Biomedis Manusia PBTDK)
5. Dr.Anis Karuniawati Phd,SpMK. (Mikrobiologi Universitas Indonesia)
6. Dra.Conny Riana Tjampakasari ,DMM,M.Biomed.(Mikrobiologi Universitas Indonesia)

DAFTAR PUSTAKA

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. Pusat Komunikasi Publik Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 2008
6. Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. Laporan Hasil Investigasi KLB Diare di Kabupaten Nabire dan Kabupaten Paniai. 2008.
7. Islam M, Kabir, Tariqul I, Rakib A. Coagglutination: A Rapid and Sensitive Assay Method for Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups Directly from Stool Specimens. 2004; 7 (8):1360 - 4.
8. Nato F, Boutonnier A, Rajerison, Grosjean P, Darteville S, Guenole A, et al. One – Step Immunochromatographic Dipstick Tests For Rapid Detection. 2003 May; 10(3): 476-8.
9. Rahman M, David A, Mahmood S, Hossaini A. Rapid Diagnosis of Cholera by Coagglutination Test Using 4-h Fecal Enrichment Cultures. 1987 Nov; 25(11): 2204 - 6 .
10. Bhuiyan NA, Qadri F, Faruque, Malek MA, Salam MA, Nato F. Use of Dipsticks for Rapid Diagnosis of Cholera Caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 from Rectal Swabs . 2003; 22(3):222-4.
11. 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.
12. Julie R. Harris, Elizabeth C C, Aglae A, Jean C B, Cheryl B, Parson B Michele et al. Field evaluation of Crystal VC_ Rapid Dipstick test for cholera during a cholera outbreak in Guinea-Bissau.2009 Sept;14(9): 1117– 21.
13. Richard A, Finkelstein, Eugene H. Rapid Identification of Cholera Vibrios with Fluorescent Antibody. Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D. C.1959 June

14. Power A David, J Peggy, Manual of BBL Products and Laboratory Procedures, Sixth edition; 1988.
15. Wilson James, Reilly L V, Bismuth Sulphite Media for The Isolation of *V.cholerae*, Public Health Laboratories, Queen's University, Belfast; 1960.
16. Jawetz, Melnick, Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran. Buku Kedokteran EGC, Jakarta; 2005.p.274 - 76.
17. Lesmana M. *Vibrio & Campylobacter*. Universitas Trisakti. Jakarta. 2003.p .4 – 23.
18. Chaudhuri,K, Cholerae Toxin , Indian Institute of Chemical Biology, India;2009.
19. Prescott Lansing. Microbiology. Graw-Hill Companies; 2002 October. p. 42 - 113.
20. Lindmark Barbro, Modulators of *Vibrio cholerae* predator interaction and virulence, Department of Molecular Biology Umea University, Sweden; 2009.
21. Immunochromatographic one step Rapid visual test for *Vibrio cholerae*. Crstal VC. Span Diagnostics Ltd; 2011.
22. Widyaratih Adila. Interaksi Antara Immunoglobulin G(IgG) Berbagai Jenis Serum Mamalia dengan Protein A *Staphylococcus aureus* Menggunakan Metode Hambatan Pertumbuhan. FKH.IPB. Bogor;2003.
23. Rahman M, Sack D A, Wadood A, Yasmin M, Latif A. Rapid identification of *Vibrio cholerae* serotype O1 from primary isolation plates by a coagglutination test.1989; 28 (19): 39-41
24. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar, Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto: 2008
25. Meiyanti, Oktavianus CH, Julius E, Lesmana M. Alkaline Pepton Water Plus 0,5 % agar Suitable for Transfort of *Vibrio cholerae*. Universa Medicina: , Agustus 2011.
26. Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. Clinical Microbiology Reviews. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48.
27. Lesmana Murad. Perkembangan mutakhir infeksi kolera.journal kedokteran Trisakti. 2004 Juli – Sept .:23 (3).
28. Lesmana Murad. Salmonella Shigella. Universitas Trisakti. Jakarta; 2003.
29. J. El-Jakee, Ata S. Nagwa, Bakry,M.A., Sohier, M. Syame, Samy A.A., Khairy E.A. Implementation of a rapid procedure for distinguishing enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. 2010;6(11).

30. 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.
31. Sechter I, Gerichter Ch.B, Cahan D. Method for Detecting Small Numbers of *Vibrio cholerae* in Very Polluted Substrates. 1975 June; 29(6): 814 - 8.
32. Mukherjee P, Ghosth S, Ramamurthy T, Mihir et al. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic dipstick Kit for Diagnosis of Cholera Emphasizes Its Outbreak utility. 2010;(63): 234– 8.
33. Infectious Disease Epidemiology Section. Cholerae and other Vibrios, Office of Public Health, Louisiana Dept of Health & Hospitals; 2006. p.2.
34. Faruque SH, Albert MJ, Mekalanos. Epidemiology, and Ecology of Toxigenic *Vibrio Cholerae*. 1998 Dec; 62(4): 1301– 14

Lampiran 1.

Bahan dan Alat yang digunakan

1. Reagen Koaglutinasi

● Bahan :

- Protein A , Insoluble P7155
- Antisera *Vibrio cholerae* O1 Polivalen
- Larutan phosphate buffer saline

● Alat :

- Waterbath
- Mikroskop
- Centrifugasi

2. Strip Immunochromatographic *V.cholerae* O1 dan O139 produk Crystal VC

3. Medium pengayaan

● Medium bismuth sulphite

- Amonium citrate
- Amonium hidroksida
- Bismuth sulphite
- Natrium nitrit
- Glukosa
- Etanol

● Medium gelatin phosphate salth broth

- Gelatin
- NaCl
- K_2HPO_4

● Medium APW

- NaCl
- Pepton

● Alat

- Timbangan dan autoklaf
- Tabung reaksi

4. Kultur bakteri *V.cholerae*

- Medium TCBS
- Medium KIA, MIO, SSS
- Antisera Polivalen dan monovalen
- Inkubator

5. Kultur bakteri enterik patogen dan kultur feses normal

- Medium TCBS
- Medium MCA

- Medium SSA
 - Medium Agar Darah
 - Medium KIA, MIO, SSS
 - Antisera Polivalen dan monovalen
 - Inkubator
6. Bahan suspensi bakteri dan hitung koloni
- Medium APW
 - Larutan phosphate buffer saline
 - Nefelometer
 - Pipet 1000 ul, 500 ul
 - Vortex
 - Inkubator

Lampiran 2. Data hasil pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada medium pengayaan

1. Medium *bismuth sulphite*

Waktu Inkubasi (dalam 30 menit)	Kontrol Negatif	Jumlah sel bakteri <i>V.cholerae</i> O 1 dalam OD (optical density)													
		10 ⁷		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
		37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,02	0,03	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,03	0,04	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,04	0,06	0,02	0,03	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,06	0,08	0,03	0,04	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,09	0,10	0,04	0,05	0,02	0,03	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,11	0,13	0,06	0,08	0,03	0,04	0,02	0,03	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,13	0,15	0,09	0,10	0,04	0,06	0,03	0,05	0,02	0,04	0,02	0,02	0,00	0,00
9	0,00	0,14	0,17	0,11	0,12	0,06	0,08	0,05	0,07	0,04	0,06	0,02	0,03	0,00	0,00
10	0,00	0,17	0,19	0,13	0,14	0,09	0,10	0,08	0,09	0,06	0,07	0,04	0,05	0,00	0,01
11	0,00	0,22	0,24	0,14	0,15	0,11	0,12	0,10	0,11	0,08	0,09	0,05	0,06	0,00	0,02
12	0,00	0,25	0,27	0,17	0,18	0,13	0,14	0,11	0,12	0,09	0,11	0,07	0,08	0,00	0,03
13	0,00	0,27	0,30	0,22	0,24	0,14	0,15	0,13	0,13	0,12	0,12	0,08	0,10	0,01	0,05
14	0,00	0,32	0,38	0,25	0,27	0,17	0,18	0,15	0,15	0,14	0,14	0,09	0,11	0,02	0,07
15	0,00	0,36	0,43	0,27	0,29	0,20	0,24	0,17	0,18	0,16	0,17	0,10	0,12	0,04	0,09
16	0,00	0,41	0,47	0,35	0,35	0,25	0,27	0,19	0,22	0,17	0,19	0,11	0,13	0,06	0,10
Kultur <i>V.cholerae</i> O1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2. Medium gelatin phosphate salt broth

Waktu Inkubasi (dalam 30 menit)	Kontrol Negatif	Jumlah sel bakteri <i>V.cholerae</i> O 1 dalam OD (optical density)													
		10 ⁷		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
		37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
1	0,00	0,04	0,05	0,01	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,05	0,08	0,02	0,05	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,08	0,12	0,04	0,07	0,02	0,04	0,01	0,03	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,10	0,18	0,06	0,10	0,04	0,06	0,02	0,05	0,01	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00
5	0,00	0,13	0,20	0,07	0,12	0,06	0,08	0,04	0,06	0,02	0,05	0,01	0,04	0,00	0,00
6	0,00	0,15	0,23	0,08	0,16	0,07	0,09	0,06	0,08	0,03	0,07	0,02	0,06	0,00	0,00
7	0,00	0,17	0,25	0,10	0,18	0,09	0,12	0,08	0,10	0,05	0,09	0,03	0,08	0,00	0,00
8	0,00	0,20	0,28	0,13	0,22	0,12	0,14	0,10	0,12	0,07	0,11	0,05	0,09	0,01	0,01
9	0,00	0,24	0,30	0,15	0,24	0,14	0,18	0,12	0,16	0,10	0,12	0,07	0,11	0,02	0,02
10	0,00	0,29	0,36	0,19	0,27	0,17	0,21	0,15	0,19	0,12	0,15	0,09	0,13	0,03	0,04
11	0,00	0,32	0,40	0,24	0,30	0,19	0,23	0,17	0,22	0,14	0,20	0,12	0,17	0,05	0,05
12	0,00	0,34	0,45	0,30	0,35	0,22	0,26	0,19	0,24	0,16	0,22	0,14	0,20	0,06	0,06
13	0,00	0,35	0,50	0,34	0,37	0,26	0,29	0,24	0,28	0,18	0,25	0,16	0,24	0,07	0,08
14	0,00	0,37	0,57	0,35	0,41	0,28	0,32	0,27	0,30	0,20	0,28	0,18	0,26	0,09	0,10
15	0,00	0,38	0,58	0,37	0,43	0,35	0,38	0,30	0,32	0,24	0,30	0,20	0,28	0,12	0,12
16	0,00	0,40	0,60	0,39	0,47	0,37	0,42	0,32	0,37	0,28	0,35	0,24	0,32	0,14	0,13
Kultur <i>V.cholerae</i> O1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3. Medium alkali peptone water

Waktu Inkubasi (dalam 30 menit)	Kontrol Negatif	Jumlah sel bakteri <i>V.cholerae</i> O 1 dalam OD (optical density)													
		10 ⁷		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
		37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
1	0,00	0,07	0,09	0,01	0,06	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,09	0,11	0,02	0,08	0,01	0,05	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,14	0,16	0,04	0,10	0,02	0,06	0,01	0,04	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,20	0,22	0,06	0,13	0,04	0,10	0,03	0,06	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,47	0,50	0,07	0,15	0,06	0,12	0,04	0,10	0,01	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00
6	0,00	0,59	0,63	0,08	0,17	0,07	0,15	0,07	0,13	0,02	0,07	0,00	0,05	0,00	0,00
7	0,00	0,67	0,70	0,10	0,49	0,09	0,21	0,10	0,17	0,04	0,09	0,01	0,07	0,00	0,02
8	0,00	0,70	0,76	0,13	0,55	0,12	0,24	0,14	0,20	0,07	0,12	0,02	0,09	0,00	0,03
9	0,00	0,78	0,83	0,15	0,63	0,14	0,54	0,37	0,44	0,09	0,17	0,05	0,13	0,00	0,04
10	0,00	0,84	0,93	0,19	0,68	0,17	0,65	0,43	0,50	0,13	0,20	0,18	0,18	0,01	0,06
11	0,00	0,90	0,95	0,24	0,75	0,19	0,69	0,50	0,57	0,20	0,44	0,36	0,38	0,02	0,10
12	0,00	0,98	1,05	0,30	0,90	0,22	0,75	0,56	0,66	0,41	0,55	0,40	0,47	0,03	0,13
13	0,00	1,04	1,11	0,34	0,95	0,26	0,82	0,67	0,73	0,50	0,65	0,47	0,53	0,04	0,17
14	0,00	1,07	1,10	0,35	1,01	0,28	0,90	0,74	0,82	0,61	0,70	0,54	0,59	0,07	0,20
15	0,00	1,08	1,09	0,37	1,04	0,35	0,96	0,82	0,90	0,68	0,72	0,60	0,63	0,09	0,44
16	0,00	1,07	1,10	0,39	1,07	0,37	1,01	0,90	0,93	0,72	0,80	0,68	0,70	0,18	0,50
Kultur <i>V.cholerae</i> O1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Lampiran 3. Uji statistik pertumbuhan *V.cholerae* O1 pada medium pengayaan

Descriptives

KONSENTRASI		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
APW37		96	.3945	.36250	.03700	.3210	.4679	.00	1.08	
APW42		96	.4385	.36833	.03759	.3639	.5132	.00	1.11	
GPSB 37		96	.1440	.11928	.01217	.1198	.1681	.00	.40	
GPSB 42		96	.1929	.14737	.01504	.1631	.2228	.00	.60	
BS37		96	.0864	.09434	.00963	.0672	.1055	.00	.41	
BS42		96	.0983	.10362	.01058	.0773	.1193	.00	.47	
Total		576	.2258	.26995	.01125	.2037	.2479	.00	1.11	
Model	Fixed Effects			.23190	.00966	.2068	.2447			
	Random Effects				.06250	.0651	.3864			.02288

Test of Homogeneity of Variances

KONSENTRASI

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
130.954	5	570	.000

ANOVA

KONSENTRASI					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.250	5	2.250	41.839	.000
Within Groups	30.652	570	.054		
Total	41.902	575			

Homogeneous Subsets

KONSENTRASI

		N	Subset for alpha = 0.05		
MEDIUM	1		2	3	
Tukey B ^a	BS37	96	.0864		
	BS 42	96	.0983		
	GPSB 37	96	.1440	.1440	
	GPSB 42	96		.1929	
	APW37	96			.3945
	APW42	96			.4385

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 96,000.

Lampiran 4. Hasil uji diagnosis cepat dengan spesimen *V.cholerae* O1 + feses normal dalam medium pengayaan

1. Suhu 37 ° C

JAM	PENGUJIAN	10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
		APW	GPSB	APW	GPSB	APW	GPSB	APW	GPSB
Ke 1	Hitung koloni	8,4 x 10 ⁵	6,0 x 10 ³	3,3 x 10 ³	2,2 x 10 ²	2,3 x 10 ³	24	4	2
	Log 10	5,92	3,78	3,51	2,34	3,36	1,38	0,60	0,30
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 2	Hitung koloni	1,7 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵	1,1 x 10 ³	1,5 x 10 ⁴	2,7 x 10 ²	48	6
	Log 10	6,23	5,17	5,38	3,04	4,17	2,43	1,68	0,78
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 3	Hitung koloni	1,7 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁵	2,8 x 10 ³	574	18
	Log 10	7,23	6,30	6,34	4,30	5,23	3,44	2,76	1,25
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 4	Hitung koloni	1,9 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	60
	Log 10	8,27	7,17	7,39	5,34	6,23	4,28	4,17	1,78
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 5	Hitung koloni	2,1 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵	3,6 x 10 ²
	Log 10	8,32	7,27	8,36	6,30	6,44	5,17	5,34	2,56
	Strip	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 6	Hitung koloni	1,3 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁸	2,9 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	2,9 x 10 ³
	Log 10	9,11	8,36	8,32	6,46	8,25	6,25	6,26	3,46
	Strip	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Ke 7	Hitung koloni	2,0 x 10 ⁹	2,7 x 10 ⁸	2,7 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁷	2,8 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁵
	Log 10	9,30	8,43	8,43	7,08	8,44	7,04	8,27	5,17
	Strip	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Ke 8	Hitung koloni	2,2 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁵
	Log 10	9,34	9,25	9,34	8,39	9,20	8,34	9,07	5,46
	Strip	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

2. Suhu 42°C

JAM	PENGUJIAN	10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
		APW	GPSB	APW	GPSB	APW	GPSB	APW	GPSB
Ke 1	Hitung koloni	1,6 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁵	2,6 x 10 ²	1,5 x 10 ⁴	57	2,6 x 10 ²	13
	Log 10	6,20	4,30	5,18	2,41	4,20	0,69	2,42	1,11
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 2	Hitung koloni	1,7 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁶	2,5 x 10 ³	1,6 x 10 ⁵	1,8 x 10 ³	1,6 x 10 ⁴	52
	Log 10	7,23	4,49	6,19	3,39	5,20	3,25	4,20	1,71
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 3	Hitung koloni	1,8 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁵	2,0 x 10 ³
	Log 10	7,25	5,49	7,17	4,20	6,20	4,27	5,19	3,30
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 4	Hitung koloni	1,9 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁴
	Log 10	8,30	6,49	7,36	5,20	7,20	4,41	6,14	4,36
	Strip	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 5	Hitung koloni	2,6 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁷	1,8 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁷	1,7 x 10 ⁵
	Log 10	8,41	8,38	8,24	5,38	7,46	4,49	7,25	5,23
	Strip	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ke 6	Hitung koloni	1,5 x 10 ⁹	1,5 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹	1,9 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁵
	Log 10	9,17	9,17	8,40	6,27	8,34	6,20	8,20	5,36
	Strip	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Ke 7	Hitung koloni	2,2 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁹	1,7 x 10 ⁹	2,8 x 10 ⁸	2,7 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁷
	Log 10	9,34	9,34	9,24	7,44	8,43	6,43	8,40	7,25
	Strip	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	Koaglutinasi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Ke 8	Hitung koloni	2,4 x 10 ⁹	2,4 x 10 ⁹	2,4 x 10 ⁹	1,1 x 10 ⁹	1,7 x 10 ⁹	2,7 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁹	2,7 x 10 ⁸
	Log 10	9,38	9,38	9,37	8,04	9,23	7,30	9,07	7,43
	Strip	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Koaglutinasi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Lampiran 5. Uji statistik spesimen *V.cholerae* O1 + feses normal dalam medium pengayaan

Oneway

Descriptives

KONSENTRASI										
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
APW 37		32	6.5694	2.41263	.42650	5.6995	7.4392	.54	9.35	
APW 42		32	7.2294	1.97548	.34922	6.5171	7.9416	2.42	9.44	
GPSB37		32	4.9372	2.53663	.44842	4.0226	5.8517	.17	9.25	
GPSB42		32	5.7291	2.48623	.43951	4.8327	6.6254	1.11	9.37	
Total		128	6.1162	2.49095	.22017	5.6806	6.5519	.17	9.44	
Model	Fixed Effects			2.36321	.20888	5.7028	6.5297			
	Random Effects				.49870	4.5292	7.7033			82030

Test of Homogeneity of Variances

KONSENTRASI

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.547	3	124	.206

ANOVA

KONSENTRASI					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	95.503	3	31.834	5.700	.001
Within Groups	692.513	124	5.585		
Total	788.016	127			

Homogeneous Subsets

KONSENTRASI

Tukey B

MEDIUM	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
GPSB 37	32	4.9372		
GPSB42	32	5.7291	5.7291	
APW 37	32		6.5694	6.5694
APW 42	32			7.2294

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.