

ISOLASI, KARAKTERISASI DAN PENGELOMPOKAN STRAIN *Salmonella typhi* ASAL KABUPATEN SUMBA BARAT DAYA NUSA TENGGARA TIMUR BERDASARKAN SIFAT-SIFAT FENOTIP

Charis Amarantini*, Langkah Sembiring**, Haripurnomo Kushadiwijaya*** dan Widya Asmara ****

* Fakultas Biologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Jl. Dr. Wahidin Sudirohusodo 9-13 Yogyakarta. 55224.

E-mail: charis@ukdw.ac.id.

** Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*** Field Epidemiology Training Program, Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

**** Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Olah Raga, Karangmalang, Yogyakarta.

ABSTRACT

*Typhoid fever is highly endemic in the South-West Sumba Regency, East Nusa Tenggara. The incidence rate of the diseases is high estimated at 725/100,000. It is an acute systemic infection caused by **Salmonella typhi**. The clinical symptoms of the disease are extremely diverse, starting from the mild form to severe ones with the most feared complication being perforation within the small intestine. Therefore, it is important to perform isolation, characterization, and grouping of **S. typhi** strains from the blood culture in order to determined definitely diagnosis and the different phenotypic characteristics in the community. Isolation was done in selective and differential media: BacT/ALERT FA culture media, Selenite Cystine Broth, Chromocult Coliform Agar, MacConkey Agar, and Salmonella Shigella Agar. The typical colony of **Salmonella** was confirmed on Triple Sugar Iron Agar, Urea agar, and L-Lysine decarboxylation media. Phenotypic characteristics of all isolates were identified using API 20E and API 50CHE diagnostics. Based on biochemical characteristics the result showed that 18 strains obtained from different geographical origins were diverse. Four strains have similarity value 100% while the remained strains have similarity value 86.3–98.4%. All of the strains were categorized in the species of **S. typhi**.*

Key words: *Salmonella typhi* strains, typhoid fever, phenotypic characteristics, similarity

PENGANTAR

Kasus tifoid secara global diperkirakan mencapai 17–22 juta per tahun dan yang terkait dengan kematian sebesar 216.000–600.000 per tahun (Steele, 2008). Angka kesakitan tifoid di Kabupaten Sumba Barat Daya, Nusa Tenggara Timur (NTT) mencapai 725/100.000 penduduk, bersumber dari laporan Rumah Sakit Karitas pada tahun 2006 dan sampai saat ini belum ditangani dengan baik oleh sebab keterbatasan unit pelayanan kesehatan di daerah untuk dapat melakukan diagnosis tifoid secara laboratoris.

Demam tifoid merupakan infeksi sistemik akut yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipe Typhi (*Salmonella typhi*). Infeksi sistemik akut ini menyebabkan kuman *S. typhi* dapat masuk ke dalam aliran darah setelah melalui beberapa organ yang terdapat dalam berbagai sistem di dalam tubuh inang. Penyakit ini memperlihatkan gejala klinis yang bervariasi mulai dari keadaan sakit ringan disertai sedikit demam, badan terasa tidak enak, batuk sampai pada keadaan klinis yang berat seperti nyeri abdominal dan komplikasi. Kondisi ini sering dapat menyebabkan kesulitan dalam menegakkan diagnosis demam tifoid apabila hanya berdasarkan gambaran klinis

(Muliawan dan Surjawidjaja, 1999; WHO, 2003). Oleh sebab itu, pemeriksaan laboratorium melalui isolasi/kultur *S. typhi* dari darah merupakan langkah diagnosis pasti demam tifoid yang harus ditempuh.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mempelajari lebih mendalam mengenai sifat-sifat biokimiawi strain-strain anggota *S. typhi* yang berasal dari penderita tifoid di Kabupaten Sumba Barat Daya, NTT. Profil sifat-sifat biokimiawi yang diperoleh akan diklasifikasikan menggunakan algoritma UPGMA *unweighted pair-group method using arithmetic averages* sehingga dapat menggambarkan deskripsi yang objektif tentang keragaman sifat-sifat biokimiawi strain-strain anggota *S. typhi* yang berasal dari penderita tifoid di Kabupaten Sumba Barat Daya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah pasien yang secara klinis didiagnosis menderita demam tifoid dengan demam lebih dari atau sama dengan 3 hari, suhu tubuh lebih

dari atau sama dengan 38,5° C dan titer Widal O lebih dari atau sama dengan 1/200. Sampel yang digunakan sebagai subjek penelitian berjumlah 189. Besaran sampel ditentukan berdasarkan angka keberhasilan kultur darah positif sebesar 80% dan dihitung pada tingkat kemaknaan 0,05 dan kekuatan uji 90% (Parry *et al.*, 1999; Lemeshow *et al.*, 1990).

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di tiga lokasi sarana kesehatan di wilayah Kabupaten Sumba Barat Daya yang memiliki fasilitas untuk uji Widal, yaitu Rumah Sakit Karitas di Weetabula, Balai Pengobatan (BP) Elopada di Kecamatan Wewewa Timur dan BP Katikuloku di Anakalang serta Rumah Sakit Kristen (RSK) Lende Moripa di Waikabubak. Waktu penelitian berlangsung dari bulan September 2007–Maret 2008.

Isolasi *Salmonella typhi*

Untuk mendapatkan isolat *S. typhi*, dilakukan isolasi dari kultur darah penderita tifoid. Sebanyak 5 ml darah (untuk pasien dewasa) atau 3 ml darah (untuk pasien anak-anak) diinokulasikan ke dalam medium BacT/ALERT FA culture media (bioMérieux Inc.) (Mc Donald *et al.*, 1996; Jorgensen *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 2001; Bourbeau dan Pohlman, 2001; Krisher *et al.*, 2001; Mirrett *et al.*, 2003) dan diinkubasikan selama 7 hari pada suhu 37° C. Selama periode inkubasi, dilakukan pengamatan pertumbuhan yang ditandai dengan perubahan warna sensor pada bagian dasar botol menjadi warna kuning dan pengamatan secara mikroskopis terdapatnya gram negatif sebagai salah satu ciri bakteri *Salmonella*.

Tahapan selanjutnya adalah *pre-enrichment* dan *selective enrichment*. *Pre-enrichment* dilakukan dalam *Buffered peptone water* (BPW). Sebanyak 10 ml kultur darah positif disentrifus dalam kondisi dingin 3000 rpm selama 15 menit. Endapan dipindahkan ke dalam 10 ml BPW dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18 jam. Kemudian dilakukan sentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Seluruh endapan sel diambil dan dipindahkan ke dalam medium *selective enrichment selenite cystine broth* (SC), diinkubasikan pada suhu 37° C selama 10–12 jam.

Sesudah tahap *selective enrichment*, dilakukan *subculture/plating* ke dalam medium *Chromocult® Coliform Agar* (CCA) (Merck), *MacConkey Agar* (Oxoid Ltd.), dan *Salmonella Shigella Agar* (SS Agar) (Oxoid Ltd.). Koloni *Salmonella*, *Shigella* dan *coliform* tampak jernih transparan dalam medium MacConkey Agar dan SS Agar, sedangkan dalam medium CCA, *Salmonella* tampak jernih

transparan atau biru terang tergantung pada ekspresi enzim β -glucoronidase (Turner *et al.*, 2000). Koloni tunggal yang dicurigai sebagai *Salmonella* diisolasi secara bertingkat beberapa kali hingga didapatkan kultur murni. Koloni tersebut disimpan dalam media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA).

Karakterisasi *Salmonella typhi*

Koloni *typical Salmonella* yang tumbuh pada media agar selektif, masing-masing diambil 10 koloni untuk dilakukan uji konfirmasi dalam medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Urea Agar*, dan *L-Lysine Decarboxylation* (Krieg dan Holt, 1982; Holt *et al.*, 2000). Isolat terpilih selanjutnya diuji sifat-sifat biokimiawi menggunakan kit API20E dan API 50CHE. Hasil deteksi reaksi dinyatakan dalam nilai + atau – berdasarkan tabel pembacaan yang disertakan dalam kemasan API 20E dan API 50 CHE. Nilai + atau – akan menentukan profil numerik. Angka profil numerik kemudian dicocokkan dengan *codebook* yang memiliki korelasi antara profil numerik dengan spesies bakteri.

Sifat fenotipik yang diperoleh dari uji pada tiap karakter yang telah dikonversikan dengan nilai positif atau negatif kemudian disajikan dalam bentuk matriks n_xt, dan n adalah sifat fenotipik sedangkan t adalah jumlah isolat dan strain acuan yang dianalisis. Data ini diatur pada program "*the programmer file editor*" (PFE). Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan program *Multivariate Statistical Package* (MVSP) versi 3,1 untuk menentukan similaritas di antara isolat-isolat menggunakan koefisien *Simple Matching Coefficient* (SSM). Pengelompokan dilakukan dengan menggunakan algoritma UPGMA dan hasilnya disajikan dalam bentuk dendrogram (Sembiring, 2002).

HASIL

Keberhasilan memperoleh isolat *S. typhi* (isolasi) dari kultur darah penderita tifoid sebesar 10,74%. Sebanyak 149 sampel diketahui menunjukkan positif kultur darah. Dari 149 sampel tersebut, dapat dilakukan isolasi *S. typhi* sebanyak 16 sampel (10,74%) atau telah diperoleh 158 isolat/strain. Keseluruhan isolat tersebut merupakan sumber data utama untuk mengkaji keragaman sifat biokimiawi, yang selanjutnya diseleksi untuk mewakili sekelompok strain berdasarkan distribusi wilayah, biotipe, dan pola resistensi terhadap antibiotik. Seleksi terhadap isolat terpilih (*dereplication*) menghasilkan 18 strain sebagai wakil dari sekelompok strain. Keseluruhan isolat tersebut dikarakterisasi menggunakan perangkat API 20E dan API 50CHE (Tabel 1).

Profil sifat-sifat biokimiawi yang diperoleh dari hasil karakterisasi tersebut diklasifikasikan menggunakan algoritma UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) dan disajikan dalam bentuk dendrogram yang menunjukkan hubungan similaritas strain-

strain anggota *S. typhi* yang berasal dari penderita tifoid di Kabupaten Sumba Barat Daya berdasarkan sifat fenotip (Gambar 1). Hasil analisis similaritas di antara strain-strain anggota *S. typhi* disajikan dalam bentuk matriks similaritas (Tabel 2).

Tabel 1. Hasil identifikasi perwakilan strain *S. typhi* hasil isolasi dari kultur darah penderita tifoid asal wilayah Kabupaten Sumba Barat Daya, NTT

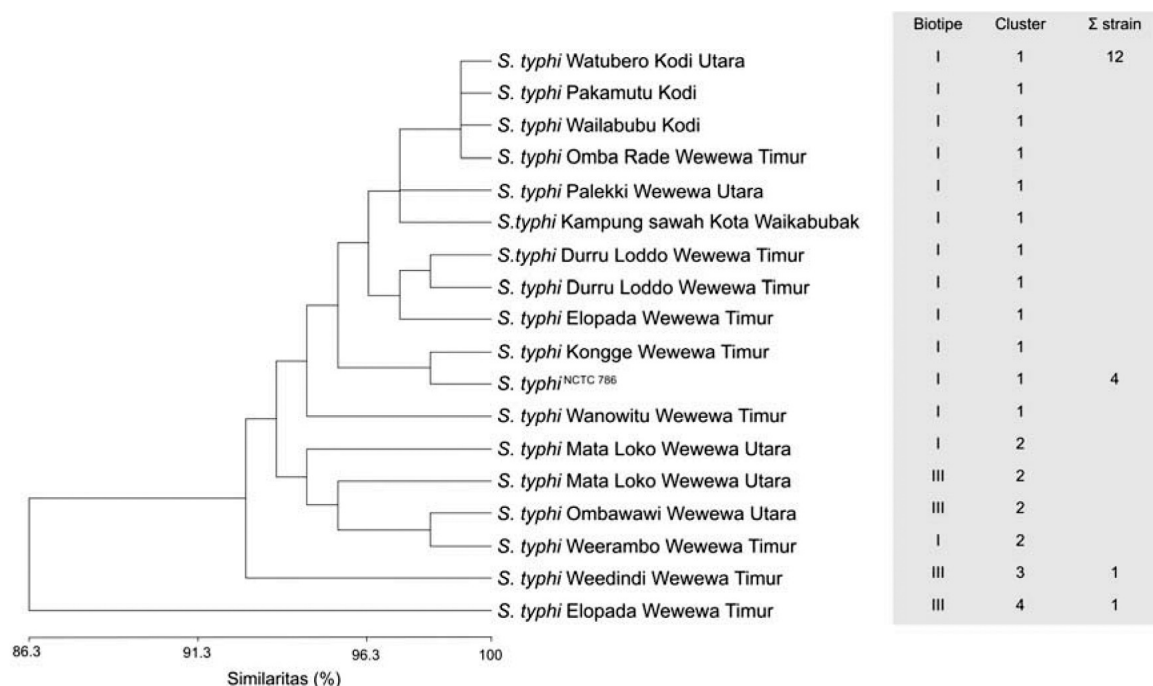
No	Asal Wilayah	Kode Isolat	Biotipe	Pola resistensi antibiotik	Hasil Identifikasi API 20E & API 50CHE
A	Watubero, Wallabubur, Kodi Utara	RSK 5.1 SSA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
B	Pakamutu, Bondo Watu, Bondokodi, Kodi	RSK 32.1 CCA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
C	Wailabubu, Kodi	RSL 2.1 CCA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
D	Palla, Mata Loko Wewewa Utara	RSK 22.2 CCA	III	S	<i>Salmonella typhi</i>
E	Palla, Mata Loko Wewewa Utara	RSK 22.4 CCA	III	S	<i>Salmonella typhi</i>
F	Ombawawi, Puu Potto, Palla Wewewa Utara	BPE 7.10 MC	III	S	<i>Salmonella typhi</i>
G	Palekki/Mahaloko, Pala Wewewa Utara	BPE 88.1 CCA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
H	Wanowitu Wewewa Timur	BPE 1.1 SSA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
I	Weerambo Wewewa Timur	BPE 74.1 CCA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
J	Omba Rade Wewewa Timur	BPE 120.1 MC	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
K	Weedindi	BPE 121.1 MC	III	S	<i>Salmonella typhi</i>
L	Durru Loddo, Letekamouna Wewewa Timur	BPE 122.1 CCA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
M	Durru Loddo, Letekamouna Wewewa Timur	BPE 122.4 CCA	I	R*	<i>Salmonella typhi</i>
N	Kongge Wewewa Timur	BPE 123.1 CCA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
O	Elopada Wewewa Timur	BPE 127.1 MC	III	R*	<i>Salmonella typhi</i>
P	Elopada Wewewa Timur	BPE 127.2 MC	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
Q	Kampung sawah Kota, Waikabubak	RSL 3.1 SSA	I	S	<i>Salmonella typhi</i>
R	PT. Biofarma	<i>S. typhi</i> NCTC 786	I	S	<i>Salmonella typhi</i>

Keterangan: * resisten terhadap *Nalidixic Acid* (NA)

Tabel 2. Matriks similaritas 18 strain *S. typhi* asal wilayah Kabupaten Sumba Barat Daya, NTT berdasarkan analisis SSM dan algoritma UPGMA

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
A	100																	
B	100	100																
C	100	100	100															
D	91,8	91,8	91,8	100														
E	96,7	96,7	96,7	95,1	100													
F	93,4	93,4	93,4	95,1	96,7	100												
G	98,4	98,4	98,4	93,4	98,4	95,1	100											
H	96,7	96,7	96,7	88,5	93,4	93,4	95,1	100										
I	95,1	95,1	95,1	93,4	95,1	98,4	96,7	95,1	100									
J	100	100	100	91,8	96,7	93,4	98,4	96,7	95,1	100								
K	95,1	95,1	95,1	90,2	95,1	91,8	93,4	91,8	90,2	95,1	100							
L	98,4	98,4	98,4	93,4	95,1	95,1	96,7	95,1	96,7	98,4	93,4	100						
M	96,7	96,7	96,7	91,8	93,4	93,4	95,1	93,4	95,1	96,7	91,8	98,4	100					
N	96,7	96,7	96,7	95,1	93,4	93,4	95,1	93,4	95,1	96,7	91,8	98,4	96,7	100				
O	88,5	88,5	88,5	83,6	88,5	85,2	86,9	85,2	83,6	88,5	86,9	86,9	85,2	85,2	100			
P	96,7	96,7	96,7	91,8	93,4	93,4	95,1	93,4	95,1	96,7	91,8	98,4	96,7	96,7	85,2	100		
Q	98,4	98,4	98,4	90,2	95,1	91,8	96,7	95,1	93,4	98,4	93,4	96,7	95,1	95,1	86,9	95,1	100	
R	95,1	95,1	95,1	93,4	91,8	91,8	93,4	91,8	93,4	95,1	90,2	96,7	95,1	98,4	83,6	95,1	93,4	100

Keterangan: Lihat Tabel 1



Gambar 1. Dendrogram yang menunjukkan hubungan antara 18 strain anggota *S. typhi* asal wilayah Kabupaten Sumba Barat Daya, NTT berdasarkan analisis SSM dan algoritma UPGMA.

PEMBAHASAN

Karakterisasi menggunakan perangkat API 20E dan API 50CHE menunjukkan keseluruhan isolat merupakan varian bakteri *S. typhi*. Berdasarkan kemampuan menggunakan d-xilosa dan L-arabinosa terdapat dua biotipe, yaitu biotipe I dan III. Biotipe I merupakan kelompok strain yang mampu menggunakan d-xilosa tetapi tidak mampu menggunakan L-arabinosa, sedangkan biotipe III merupakan kelompok strain yang mampu menggunakan d-xilosa dan L-arabinosa (Quintaes *et al.*, 2002). Selain pengelompokan berdasarkan biotipe, karakterisasi menggunakan perangkat API 20E dan API 50CHE menunjukkan terdapatnya beragam sifat biokimia dari strain-strain yang diuji.

Hasil pengelompokan berdasarkan analisis SSM dengan menggunakan algoritma UPGMA (Gambar 1) menunjukkan adanya empat klaster besar. Klaster pertama beranggotakan 12 strain anggota *S. typhi*, di dalamnya termasuk strain acuan *S. typhi* NCTC 786. Keduabelas strain anggota *S. typhi* tersebut tergolong dalam biotipe I dan bergabung dalam klaster pertama dengan nilai similaritas 94,9%. Empat strain *S. typhi* dari klaster pertama memiliki kesamaan karakter biokimiawi dengan nilai similaritas paling tinggi sebesar 100% (Tabel 2). Keempat strain tersebut berasal dari wilayah geografis yang berbeda. Satu strain berasal desa Watubero, Kecamatan Kodi Utara. Dua strain berasal dari dua desa di Kecamatan Kodi, yaitu Desa

Pakamutu, Desa Wailabubu. Satu strain lain berasal dari Desa Omba Rade, Kecamatan Wewewa Timur.

Delapan strain lain, berasal dari wilayah yang berbeda secara geografis. Lima strain berasal dari 4 desa di Kecamatan Wewewa Timur, yaitu Desa Durru Loddo (2 strain), Desa Elopada (1 strain), Desa Kongge (1 strain), dan Desa Wanowitu (1 strain). Satu strain *S. typhi* (BPE 122.4 CCA) dari Desa Durru Loddo bersifat resisten terhadap *nalidixic acid*. Strain *S. typhi* asal Kongge, Wewewa Timur memiliki kemiripan sifat fenotip dengan strain *S. typhi* NCTC 786 dengan nilai similaritas sebesar 98,3%. Adanya perbedaan wilayah geografis asal strain-strain tersebut menunjukkan mobilitas penyebaran strain-strain anggota *S. typhi* di wilayah Kodi, Kodi Utara, dan Wewewa Timur. Ketiga wilayah tersebut terletak pada jarak geografis yang cukup jauh sehingga diduga terdapat mobilitas penderita pada ketiga wilayah kecamatan tersebut.

Klaster kedua beranggotakan empat strain *S. typhi*, tiga strain berasal dari Kecamatan Wewewa Utara dan tergolong dalam biotipe III. Satu strain lainnya berasal dari Desa Weerambo Kecamatan Wewewa Timur dan tergolong dalam biotipe I. Keempat strain anggota klaster kedua bergabung pada nilai similaritas sebesar 94,5%. Kedekatan jarak geografis kedua kecamatan tersebut memungkinkan untuk terjadinya mobilitas penderita antar kedua kecamatan tersebut.

Klaster ketiga dan keempat masing-masing hanya beranggotakan satu strain yang berasal dari Desa Weedindi dan Desa Elopada di Kecamatan Wewewa Timur dan tergolong dalam biotipe III. Strain *S. typhi* asal Desa Elopada memiliki sifat resisten terhadap *nalidixic acid*, memiliki perbedaan sifat fenotip lebih besar dibanding dengan 17 strain *S. typhi* yang lain, dan bergabung dengan anggota strain *S. typhi* yang lain pada nilai similaritas paling rendah, yaitu sebesar 86,2%.

Berdasarkan karakterisasi sifat biokimiawi, sebanyak 18 strain hasil isolasi dari kultur darah penderita demam tifoid merupakan anggota *S. typhi*. Strain *S. typhi* yang berasal dari Watubero Kodi Utara, Pakamutu Kodi, Wailabubu Kodi, dan Omba Rade Wewewa Timur memiliki kesamaan sifat biokimiawi dengan nilai similaritas 100%. Sedangkan 14 strain lain memiliki sifat biokimiawi yang beragam dengan nilai similaritas antara 86,3–98,4%. Strain *S. typhi* asal Desa Kongge Wewewa Timur memiliki kedekatan karakter fenotip dengan strain acuan *S. typhi* NCTC 786 pada nilai similaritas sebesar 98,3%.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang hubungan kekerabatan secara evolusioner dari semua strain tersebut untuk mengungkap mobilitas strain-strain anggota *S. typhi* yang ada di wilayah Kabupaten Sumba Barat Daya, sehingga dapat bermanfaat untuk mengontrol penyebaran penyakit demam tifoid.

KEPUSTAKAAN

- Bourbeau PP, Pohlman JK, 2001. Three days Incubation May Be Sufficient for Routine Blood Cultures with BacT/Alert FAN Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol* 39: 2079–82.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- Jorgensen JH, Mirrett S, McDonald LC, Murray PR, Weinstein MP, Fune J, Trippy CW, Masterson M, Reller LB, 1997. Controlled Clinical Comparison of BACTEC Plus Aerobic/F Resin Medium with BacT/ALERT Aerobic FAN Medium for Detection of Bacteremia and Fungemia. *J Clin Microbiol* 35: 53–8.
- Krieg NR, Holt JG, 1982. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1. Williams & Wilkins. Baltimore/London.
- Krisher KK, Gibb P, Corbett S, Church D, 2001. Comparison of the BacT/ALERT PF Pediatric FAN Blood Culture Bottle with the Standard Pediatric Blood Culture Bottle, the Pedi-Bac T. *J Clin Microbiol* 39: 2880–3.
- Lemeshow S, Hosmer Jr DW, Klar J, Lwanga SK, 1990. *Adequacy of Sample Size in Health Studies*. John Wiley & Sons. New York, p. 1–8.
- McDonald LC, Fune J, Gaido LB, Weinstein MP, Reimer LG, Flynn TM, Wilson ML, Mirrett S, Reller LB, 1996. Clinical Importance of Increased Sensitivity of BacT/Alert FAN Aerobic and Anaerobic Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol* 34: 2180–4.
- McDonald LC, Weinstein MP, Fune J, Mirrett S, Reimer LG, Reller LB, 2001. Controlled Comparison of BacT/ALERT FAN Aerobic Medium and BACTEC Fungal Blood Culture Medium for Detection of Fungemia. *J Clin Microbiol* 39: 622–4.
- Mirrett S, Reller LB, Petti CA, Woods CW, Vazirani B, Sivadas R, Weinstein MP, 2003. Controlled Clinical Comparison of BacT/ALERT Standard Aerobic Medium with BACTEC Standard Aerobic Medium for Culturing Blood. *J Clin Microbiol* 41: 2391–4.
- Muliawan SY, Surjawidjaja JE, 1999. Tinjauan Ulang Peranan Uji Widal sebagai Alat Diagnostik Penyakit Demam Tifoid di Rumah Sakit. *Cermin Dunia Kedokteran* 124: 14–6.
- Parry CM, Hoa NTT, Diep TS, Wain J, Chinh NT, Vinh H, Hien TT, White NJ, Farrar JJ, 1999. Value of Single-Tube Widal test in Diagnosis of Typhoid Fever in Vietnam. *J Clin Microbiol* 37: 2882–6.
- Quintaes BR, Reis EMS, Fonseca EL, Hofer E, 2002. Conventional and Molecular Typing of *Salmonella typhi* Strains from Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 44: 315–9.
- Sembiring L, 2002. *Petunjuk Praktikum Sistematika Mikrobial*. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.
- Steele D, 2008. The Importance of Generating Evidence on Typhoid Fever for Implementing Vaccination Strategies. *J Infect Developing Countries* 2: 250–2.
- Turner KM, Restaino L, Frampton EW, 2000. Efficacy of Chromocult Coliform Agar for Coliform and *Escherichia coli* Detection in Foods. *Journal of Food Protection*. 63: 539–41.
- WHO, 2003. *Background Document: The Diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid Fever*. Communicable Disease Surveillance and Response Vaccines and Biologicals. pp. 1–30; 103–120. <http://www.who.int/CSR/resources/publications/drugresist/IIIAMRManual.pdf>. [3 April 2007].

Reviewer: **Tim Reviewer PBI Jawa Timur**