



Pengembangan prekultur *oxgall* sebagai sampel klinis untuk deteksi *Salmonella typhi* dengan metode real-time PCR

Development of oxgall preparation as clinical sample for detection of Salmonella typhi with real-time PCR method

Annisa Pratiwi Gunawan^{1a*}, Ai Djuminar¹, Ernawati², Lidya Chaidir³

¹ Jurusan Analis Kesehatan, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Indonesia

² Departemen Patologi Klinik, Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung, Indonesia

³ Pusat Studi TB HIV Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, Indonesia

^aEmail address: annisapратиwi.gunawan@yahoo.co.id

HIGHLIGHTS

Real Time-PCR more than better used for a clinical sample and blood culture was better using oxgall.

ARTICLE INFO

Article history

Received date : February 14th, 2018

Revised date : March 27th, 2018

Accepted date : December 31st, 2018

Keywords:

Blood Culture
Real-time PCR,
Oxgall
Salmonella typhi
Typhoid fever

Kata Kunci:

Kultur Darah
Real-time PCR
Oxgall
Salmonella typhi
Demam Tifoid

ABSTRACT / ABSTRAK

Typhoid fever is a significant public health burden in low-income countries caused by *Salmonella enterica* serotype *typhi* (*S. typhi*). Clinical manifestations of typhoid fever are varied and non-specific, making the diagnosis difficult. Using oxgall for pre-incubation as a selective culture medium before amplification of Real-time PCR in whole blood produces a fast and sensitive diagnostic. The purpose of this study was to know the performance Real-time PCR for detection of oxgall-precultured *S. typhi*. Prior to the sample process, optimization method was performed to find out that the reagents were used for clinical specimens well. In the sample process, blood samples from 30 Widal-positive patients were collected for this study. Venous blood samples from typhoid fever patients were taken on the day for diagnosis; 5 ml for blood culture, and 5 ml for Real Time-PCR. The bacteria were grown in oxgall 10% (microbiological clinics laboratory standard) and incubated for 6 hours (37° C) before bacterial DNA was isolated for Real Time-PCR detection. The results showed that reagen of Real Time-PCR more better used for a clinical sample and blood culture was better using oxgall (positive blood culture results over 24 hours). This suggests that there is a need for further research on oxgall concentrations in Real Time-PCR and duration incubation for the selection of clinical samples.

Demam tifoid merupakan beban kesehatan masyarakat yang signifikan di negara berpenghasilan rendah yang disebabkan oleh *Salmonella enterica* serotype *typhi* (*S. typhi*). Manifestasi klinis demam tifoid bervariasi dan tidak spesifik, sehingga membuat diagnosis menjadi sulit. Dengan menggunakan *oxgall* pada darah sebagai pra-inkubasi untuk media kultur selektif sebelum dilakukan amplifikasi *Real-time* PCR, agar dapat menghasilkan diagnostik lebih cepat dan sensitif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kinerja *oxgall* untuk deteksi *Salmonella typhi* dengan

amplifikasi *Real-time* PCR. Sebelum proses pengambilan sampel, dilakukan optimasi untuk mengetahui reagen yang digunakan baik untuk spesimen klinis. Sampel darah diambil sebanyak 30 pasien dengan hasil tes Widal positif. Darah diambil pada hari diagnosis sebanyak 5 ml untuk kultur darah, dan 5 ml untuk *Real-time* PCR. Bakteri ditanam di *oxgall* 10% (standar mikrobiologi laboratorium klinik) dan diinkubasi selama 6 jam (37 ° C) sebelum DNA bakteri diisolasi untuk deteksi *Real-time* PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa reagen *Real-time* PCR lebih baik sebagai sampel klinis untuk kultur darah dan reagen *oxgall* (hasil kultur darah positif lebih dari 24 jam) lebih untuk *Real-time* PCR. Hal ini menunjukkan bahwa harus ada penelitian lebih lanjut mengenai lama inkubasi dan konsentrasi *oxgall* untuk *Real-time* PCR dan pemilihan sampel klinis.

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.
All rights reserved

***Corresponding Author:**

Annisa Pratiwi Gunawan,
Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung,
Jln. Babakan Loa No. 10 A, Bandung, Indonesia.
Email: annisapradiwi.gunawan@yahoo.co.id



1. PENDAHULUAN

Demam tifoid adalah penyakit sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella enterica serovar typhi* (*S. typhi*) yang merupakan ancaman terhadap kesehatan masyarakat di banyak negara tropis dan berkembang.^{1,2} Diagnosis demam tifoid ditetapkan berdasarkan manifestasi klinis dan laboratorium. Manifestasi klinis demam tifoid bervariasi dan tidak spesifik, sehingga sulit untuk memprediksi penyakit berdasarkan gejala klinis saja.^{3,4}

Kultur darah adalah baku emas (*gold standard*) dalam pemeriksaan demam tifoid, namun metode ini memiliki sensitivitas yang rendah. Selanjutnya adanya antibiotik, dan volume sampel yang tidak mencukupi dapat mempengaruhi hasil kultur darah.^{4,5,6,7,8} Hal ini menyebabkan beberapa peneliti mulai menganjurkan penggunaan metode molekuler sebagai alternatif dalam mendiagnosis demam tifoid. *Real-time* PCR adalah teknik mengamplifikasi sekaligus menghitung jumlah target molekul DNA secara kuantitatif.^{9,10,11} *Real-time* PCR memiliki kelebihan berupa waktu prosesnya relatif lebih singkat, tidak karsinogenik, dan juga memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan dengan PCR konvensional. Dalam deteksi *Real-time* PCR juga tidak terpengaruh oleh penggunaan antibiotik dan memungkinkan pendeteksian target dapat dengan konsentrasi rendah. Kehadiran DNA dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi probe (penanda).^{12,13,14,15,16} Berdasarkan proses *Real-time* PCR, optimasi *spike Real-time* PCR penting dilakukan untuk mengetahui reagen yang digunakan baik untuk spesimen klinis. Namun, jumlah bakteri yang terlalu rendah dalam darah pasien tifoid (diperkirakan rata-rata 0,3 CFU / mL darah) membuat *S. typhi* sulit untuk dideteksi dengan *Real-time* PCR.¹⁷ Saat ini telah dikembangkan penelitian metoda *blood culture*-PCR dengan menggabungkan *pre-incubation* singkat pada *oxgall* bersamaan dengan amplifikasi PCR dari *S. typhi*. Penggabungan *oxgall* sebagai media selektif *S. typhi* dengan metode PCR bertujuan untuk mengurangi waktu penyelesaian hasil diagnostic, selain itu diharapkan dapat meningkatkan sensitivitas yang lebih tinggi.^{18,19,20,21} Berdasarkan latar belakang tersebut tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kinerja metode *oxgall-precultured Real-time*

PCR dalam mendeteksi *S. typhi* dari sampel klinis yang diperoleh dari Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung.

2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

2.1. Desain penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *cross sectional* dengan pemilihan sampel secara *consecutive sampling*. Jumlah sampel sebanyak 30 sampel pasien demam tifoid berdasarkan hasil uji Widal positif. Sampel darah diambil pada hari diagnosis sebanyak 10 mL (5 mL untuk Kultur darah ; 5 mL untuk *Real-time PCR*). Analisis data yang digunakan pada penelitian ini dengan Uji sensitivitas.

2.2. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di RS Dustira, Laboratorium Pelayanan Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung (untuk pemeriksaan bakteriologis dan ekstraksi DNA) dan di Balai Laboratorium Kesehatan (untuk Proses *Real-time PCR*).

2.3. Populasi dan sampel penelitian

Populasi dan sampel yang digunakan adalah darah utuh dari pasien demam tifoid yang diperoleh dari RS Dustira yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah pasien berjenis kelamin pria/wanita, berusia antara 18-60 tahun, dan telah terdiagnosis positif demam tifoid berdasarkan hasil widal positif. Pasien telah menderita demam tinggi kurang dari 1 minggu. Kriteria eksklusi adalah pasien yang didiagnosis bukan demam tifoid, dan pasien anak-anak.

2.4. Bahan dan alat penelitian

Sampel Darah (positif demam tifoid), KIT INSERT *G-Spin™ Total DNA Extraction*, kit *Real-time PCR* gen *invA Salmonella typhi* (NEXTM Diagnostic, Malaysia-Korea), *Oxgall* 10 %, Media SS, TSIA, Manitol, Pepton, Semi Solid, *Real-time PCR*,

2.5. Koleksi/tahapan penelitian

2.5.1. Opimasi Metode *Spike*

Sampel klinis darah orang sehat dibuat dengan dua perlakuan, yaitu darah tanpa proses *spike*, dan darah dengan proses *spike* dari isolat *S. typhi*, kemudian dilakukan proses seperti pada sampel terhadap kultur darah dan proses *Real-time PCR* dengan dan tanpa penambahan *oxgall*.

2.5.2. Proses Sampel

Sampel darah dari 30 pasien Widal-positif sebanyak 10 mL per pasien diambil pada hari diagnosis di mana 5 mL digunakan untuk kultur darah dan 5 mL untuk *Real-time PCR*. Dalam persiapan *oxgall pre-incubation*, sampel darah pasien sebanyak 5 mL dimasukkan pada media *oxgall* 10% (standar klinik laboratorium mikrobiologi), kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 6 jam, 12 jam, 24 jam. (Khusus untuk amplifikasi *Real time-PCR* proses pra inkubasi di inkubasi selama 6 jam).

Untuk uji kultur darah *S. typhi*, dilakukan isolasi kultur darah dengan cara sampel dari media *oxgall* yang telah diinkubasi diambil dengan menggunakan ose bulat, kemudian diisolasi pada media SSA (*Salmonella Shigela Agar*). Media yang berisi isolat bakteri diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Pertumbuhan pada media SSA diamati. Koloni *S. typhi* menunjukkan warna bening dan pada bagian tengah berwarna hitam. Kemudian untuk memastikan sampel tersebut merupakan koloni dari *S. typhi* dilakukan uji biokimia. Dari koloni-koloni yang tumbuh

dilakukan sederetan tes gula-gula yaitu TSIA, Manitol, Pepton dan Semi Solid, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Untuk uji *Real-time* PCR, dilakukan dua perlakuan, yaitu sampel darah dengan dan tanpa kombinasi dengan *oxgall*. Sebelum dilakukan proses *Real time*-PCR, dilakukan proses ekstraksi terlebih dahulu. Proses ekstraksi DNA dilakukan menurut panduan dalam KIT INSERT *G-Spin™ Total DNA Extraction*. Jenis primer yang digunakan adalah primer yang terdapat pada kit *Real-time* PCR gen *invA* *Salmonella typhi* (NEXTM Diagnostic, Malaysia-Korea). Kit ini menggunakan sepasang primer untuk *internal amplification control* (IAC) guna mendeteksi amplifikasi gen *invA* *Salmonella typhi*. Hasil *Real-time* PCR dengan sepasang primer tersebut yaitu gen target *invA* dan IAC memiliki *Tm* (*melting temperature*) yang berbeda. Pengujian *Real-time* PCR menggunakan mesin BIORAD iQ 5. Analisis data di sajikan dalam bentuk gambar hasil dari mesin BIORAD iQ 5.

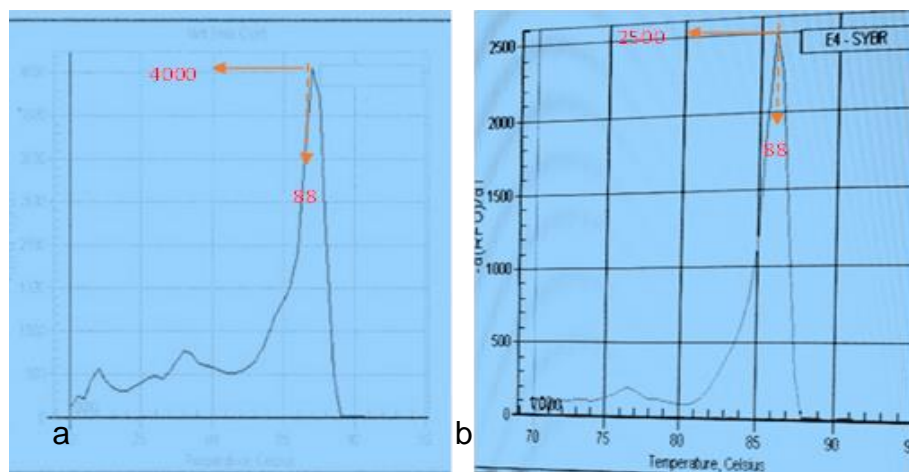
2.6. Analisis data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer sebagai hasil dari kurva amplifikasi *Real-time* PCR dengan sampel sebelum dan setelah penanaman pada media *oxgall* dengan lama inkubasi selama 6 jam pada suhu 37°C, dan hasil kultur darah *S. typhi*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Optimalisasi Metode *Spike*

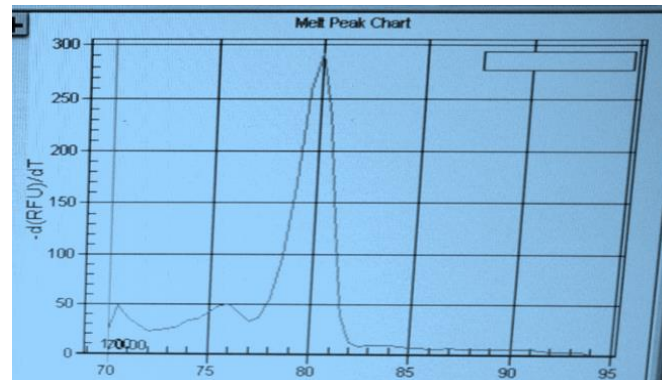
Hasil optimasi spesimen klinis *Real-time* PCR tanpa inkubasi *oxgall* dari kelompok darah pasien demam tifoid dengan proses *spike* menunjukkan hasil positif (**Gambar 1a**), sedangkan hasil *Real-time* PCR tanpa inkubasi di *oxgall* dari kelompok darah pasien demam tifoid tanpa proses *spike* menunjukkan hasil negatif (**Gambar 2**). Hasil optimasi spesimen klinis *Real-time* PCR dengan penambahan *oxgall* 10% diinkubasi selama 6 jam dari kelompok darah pasien demam tifoid dengan proses *spike* menunjukkan hasil negatif (**Gambar 1b**). Hasil kultur darah dari kelompok darah pasien demam tifoid dengan proses *spike* menunjukkan hasil positif pada 24 jam.



Gambar 1. Hasil Optimalisasi *Spike* *Real-Time* PCR *Whole Blood*. (a) *Real-Time* PCR *Whole Blood* Dengan Proses *Spike* Yang Diberi *Oxgall* Dengan Inkubasi 6 Jam.; (b) *Real-time* PCR *Whole Blood* Dengan Proses *Spike* Tanpa *Oxgall*.

3.2. Pengolahan Sampel

Hasil sampel klinis menunjukkan dari 30 sampel positif widal hanya ada 1 sampel positif kultur darah. Hasil metode *Real-time* PCR dengan dan tanpa penambahan *oxgall* 10% menunjukkan tidak ada hasil yang positif (gambar 2).



Gambar 2. *Real-time* PCR *Whole Blood* Dengan dan Tanpa Penambahan *Oxgall*, Hasil DNA *Salmonella* Negative.

Metode *spike* merupakan metode penambahan isolat DNA *S. typhi* pada sampel. Proses *Real-time* PCR menggunakan primer dari kit RT-PCR gen *invA* *Salmonella typhi* (NEXTM Diagnostic, Malaysia-Korea), menunjukkan 2 puncak spesifik yang dihasilkan untuk *Internal Amplification Control* (IAC) dengan $T_m = 78-80$ dan DNA *S. typhi* dengan $T_m = 87-89$. T_m (*Melting Temperature*) menunjukkan isolat *S. typhi* secara spesifik. Dalam hasil optimasi dengan metode *spike* menunjukkan bahwa DNA yang berasal dari spesimen *whole blood* dengan proses *spike* yang diinkubasi dengan *oxgall* selama 6 jam teramplifikasi lebih baik dari *whole blood* dengan proses *spike* tanpa penambahan *oxgall*. Terlihat hasil positif dari hasil amplifikasi yang meningkat dengan adanya penambahan *oxgall* yang diinkubasi selama 6 jam (Gambar 1a; 1b). Hasil negatif pada perlakuan sampel tanpa proses *spike* menunjukkan adanya kontrol negatif serta tidak adanya kontaminasi dalam proses ekstraksi sampai dengan proses *Real-time* PCR. Hal ini menunjukkan bahwa reagen kit ini sangat baik digunakan untuk spesimen bahan klinis *whole blood* pasien demam tifoid.

Berdasarkan hasil penelitian responden yang mengalami demam lebih dari 8 hari sebanyak 73,3%. Keberadaan *S. typhi* dalam darah akan menurun pada minggu pertama. Rata-rata orang Indonesia yang pergi ke rumah sakit mengalami demam lebih dari 4-5 hari atau pada saat infeksi sekunder, sehingga sulit mendeteksi *S. typhi* dalam darah.^{22,23} Hasil leukosit pada karakteristik subjek penelitian menunjukkan bahwa 50% leukosit pasien normal, ini menunjukkan infeksi *S. typhi* tidak ada atau tubuh sudah mengalami perbaikan, karena hampir semua subjek penelitian telah diberi antibiotik. Pemeriksaan widal berdasarkan hasil karakteristik subjek pasien yaitu hasil positif terdapat pada 30 subjek penelitian (100%), namun pemeriksaan widal bukan menjadi acuan diagnosis demam tifoid dalam penelitian ini karena memiliki sensitivitas yang rendah.²⁴

Pemeriksaan kultur darah pada subjek penelitian diperoleh dengan hasil kultur positif hanya 1 pasien (3,3%) dan hasil kultur negatif adalah 29 pasien (96,7%). Hasil ini sesuai dengan penelitian Stella (2015)⁵ dan Lalith (2012)⁴, melaporkan bahwa distribusi kultur positif di bawah 20%. Hal ini disebabkan tingginya penggunaan antibiotik di daerah endemik yang menyebabkan sensitivitas kultur darah menjadi lebih

rendah (10-20%). Selain itu, volume darah kurang yang bisa menyebabkan hasil kultur darah lebih rendah (standar 10-15 mL).^{4,5,6,7,8,24}

Berdasarkan hasil optimasi *Internal Amplification Control* (IAC) dengan $T_m = 78-80$ dan DNA *S. typhi* dengan $T_m = 87-89$ didapatkan hasil *Real-time* PCR dengan dan tanpa *oxgall* adalah negatif. Hasil konsentrasi batas limit deteksi dalam optimasi *Real-time* PCR adalah 10^4 CFU/mL.²⁵ Hasil negatif menunjukkan kemungkinan *Salmonella typhi* dalam *whole blood* kurang dari 10^4 CFU/mL. Selain itu konsentrasi *oxgall* yang digunakan dalam penelitian adalah 10%, ini sesuai dengan prosedur standar laboratorium pelayanan di rumah sakit dan laboratorium mikrobiologi. Dalam penelitian ini, *whole blood* diinkubasi dengan *oxgall* selama 6 jam. Hasil negatif kemungkinan disebabkan karena *Salmonella typhi* belum cukup bereplikasi sampai batas limit deteksi, sehingga perlu tambahan waktu inkubasi untuk *Salmonella typhi* bereplikasi dalam *oxgall*.

Penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan metode *Real-time* PCR pada *S. typhi* dari sampel darah. Namun sebelum kit ini dapat dipasarkan dan dapat digunakan di laboratorium pelayanan ataupun dilaboratorium pendidikan dan penelitian, diperlukan percobaan pemeriksaan demam tifoid dari berbagai sampel selain darah. Hal ini disebabkan karena pasien demam tifoid di Indonesia kebanyakan bersifat *carier* dan waktu pemeriksaan demam tifoid memiliki demam lebih dari 7 hari, sehingga *S. typhi* di dalam darah sudah sedikit, maka disarankan menggunakan spesimen lain seperti urine dan feses untuk melihat spesimen yang teramplifikasi lebih baik, sehingga hasil lebih obyektif dan dapat memberi kesimpulan yang lebih komplit serta meningkatkan keberhasilan deteksi demam tifoid dengan sensitivitas yang tinggi dengan metode *Real time*-PCR.

4. SIMPULAN DAN SARAN

Hasil optimasi reagen menunjukkan bahwa reagen yang digunakan sangat baik untuk sampel klinis. Pemeriksaan kultur darah untuk diagnosis demam tifoid tidak bisa diganti dengan pemeriksaan *Real-Time* PCR. Untuk meningkatkan hasil *Real-Time* PCR *Salmonella typhi* perlu dilakukan penelitian lanjutan, dengan mengoptimalkan konsentrasi *oxgall* dan waktu inkubasi di media *oxgall* serta pemilihan sampel klinis dalam mendiagnosis demam tifoid yang menggunakan *Real-Time* PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada semua pihak yang telah membantu pada penelitian ini. Utamanya kepada Tim *Typhoid Fever Study* Fakultas Kedokteran Unpad (Dr. Bachtis Alisjahbana, Mandala Aji), MDx Biotechnology Sdn. Bhd., Kuala Lumpur, Malaysia atas bantuan kit REAL TIME PCR, RS Dustira (*Tuanku Yusuf Tarigan*) atas bantuannya dalam pengambilan sampel, dan Dosen Poltekkes Kemenkes Bandung Jurusan Analis Kesehatan (Dr. Ani Riyani M.Kes dan Lis Kurniati,S.Pd.,M.Kes).

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Sistematika Pedoman Pengendalian Penyakit Demam Tifoid*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan; 2013.
2. World Health Organization. *Background Document: The Diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid Fever*. Geneva: World Health Organization; 2003.
3. Wain J, Hosoglu S. The laboratory diagnosis of enteric fever Review Article The laboratory diagnosis of enteric fever. 2008;(February):10-15. doi:10.3855/jidc.155.
4. Lalith PM, Kumar V, Chanpheaktra N, et al. Typhoid Fever Among Hospitalized Febrile Children in Siem Reap, Cambodia. *J J Trop Pediatr*. 2012;58(1).

5. Stella IS, Bamidele M, Fowora M, Helen T, Emmanuel. Application of A Point-of-Care Test for The Serodiagnosis of Typhoid Fever in Nigeria and The Need for Improved Diagnostocs. *J Infect Dev Ctries*. 2011;5(7):520-526.
6. Kundu R, Ganguly N, Ghosh TK, Yewale VN, Shah RC, Shah NK. IAP Task Force Report: Diagnosis of Enteric Fever in Children. *Indian Pediatr*. 2006;43(10):875–883.
7. Wain J, Pham VB, Ha V, et al. Quantitation of Bacteria in Bone Marrow from Patients with Typhoid Fever: Relationship Between Counts and Clinical Features. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1571-1576. doi:0.1128/JCM.39.4.1571–1576.2001.
8. Wain J, Diep TS, Bay PVB, et al. Specimens and Culture Media for The Laboratory Diagnosis of Typhoid Fever. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2(6):469-474. doi:10.3855/jidc.164.
9. Hatta M, Smits HL. Detection of Salmonella Typhi by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine, and Stools Samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(1):39-143. doi:10.4269/ajtmh.2007.76.139.
10. Ambati SR, Nath G, Das BK. Diagnosis of Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction. *Indian J Pediatr*. 2007;74(10):909-913.
11. Dorak TM. *Real-Time PCR*. Newcastle: Taylor and Francis Group; 2006.
12. Julie L, Edwards K, Saunders N. *Current Technology and Applications Real-Time PCR*. Norfolk: Caister Academic Press; 2009.
13. Ibrahim WA, El-Ghany WA, Nasef SA, Hatem M. Comparative Study On The Use Of Real Time Polymerasechain Reaction (Real-time PCR) And Standard Isolation Techniques For The Detection Of Salmonellae In Broiler Chicks. *Int J Vet Sci Med*. 2014;2(1):67-71.
14. Siregar TH, Elliman J, Owens L. Development Of Real Time Polymerase Chain Reaction for Detection Salmonella Typhimurium and Salmonella enteriditis in Fish. *Squalen*. 2012;7(2):51-58.
15. Mufty MM. Application of A Real-time qPCR Method for Detection of Salmonella sp. in Shrimp and Scallop and Its Partial Validation. 2008.
16. Fatimi H. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Palembang: Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya; 2010.
17. Zhou L, Jones C, Gibani MM, et al. Development and Evaluation of a Blood Culture PCR Assay for Rapid Detection of Salmonella Paratyphi A in Clinical Samples. *PLoS One*. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0150576.
18. Coleman W, Buxton BH. The Bacteriology of The Blood in Convalescence from Typhoid Fever with A Theory of The Pathogenesis of The Disease. *J Med Res*. 1909;21(1):83-93.
19. Kaye D, Palmieri M, Rocha H. Effect of Bile on the Action of Blood Against Salmonella. *J Bacteriol*. 1966;91(3):945-952.
20. Zhou L, Pollard AJ. A Novel Method of Selective Removal of Human DNA Improves PCR Sensitivity for Detection of Salmonella Typhi in Blood Samples. *BioMed Cent Infect Dis*. 2012. doi:10.1186/1471-2334-12-164.
21. Prakash P, Mishra P, Singh AK, Gulati AK, Nath G. Evaluation of Nested PCR in Diagnosis of Typhoid Fever. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):431-432. doi:0.1128/JCM.43.1.431-432.2005.
22. Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philladelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997.
23. Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and Paratyphoid Fever. *Lancet*. 2005:749-762. doi:10.1016/S0140-6736(05)67181-4.
24. Andualem G, Abebe T, Kebede N, Gebre-Selassie S, Mihret A, Alemayehu H. A Comparative Study of Widal Test with Blood Culture in The Diagnosis of Typhoid Fever in Febrile Patients. *BioMed Cent Res Notes*. 2014. doi:10.1186/1756-0500-

- 7-653.
25. Ernawati. Perbandingan positività pemeriksaan Real-time PCR (REAL TIME PCR) Gen *invA* *Salmonella typhi* Dari Bahan Biologis Tersimpan Buffycoat dengan Pemeriksaan Kultur dari Sampel Darah Segar untuk Mediagnosis Demam Tifoid. 2016.