

KONSENTRASI CARBOL FUCHSIN DAN WAKTU PENYIMPANAN SEDIAAN HAPUSAN SPUTUM +2 HASIL PEWARNAAN ZIEHL NEELSEN

Fihiruddin, Nurul Inayati

Abstract: Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Laboratory diagnosis of TB disease can be confirmed by microscopic examination using the Ziehl Neelsen Methode by carbol fuchsin dye with concentration is 0.3% which it is the standard procedure. to reduce the error rate of performed sputum smear examination must be carried out by laboratories established in a network of TB laboratory services. This study aims to determine the concentration of carbol fuchsin and time effective storage of performed sputum smear that show 2+ Ziehl Neelsen staining, and analyze the differences of each carbol fuchsin concentration and storage time. This study was an experimental study. The result showed the average number of acid-resistant bacteria with carbol fuchsin concentration 0.3% is as much as 23, the concentration 1% carbol fuchsin is as much as 54 and the concentration 2% carbol fuchsin is as much as 2. Based on the average amount of storage time, Acid-resistant bacteria (BTA) that storage under 1 month (0 month) was available as many as 34, storage for 1 month as many as 28 and stored for 2 months as many as 23, whereas stored for 3 months as many as 18. Based on the survey results know that the concentration of carbol fuchsin that provide maximum results for Ziehl Neelsen staining is concentrations 1% and the storage time of performed sputum smear 2+ is not more than 1 month. Results of statistical analysis indicating that there is significant different at each concentration carbol fuchsin and storage time with of p value <0.05.

Kata Kunci: Concentration Carbol Fuchsin, Storage Time, Color Smear.

LATAR BELAKANG

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular langsung yang disebabkan oleh bakteri berbentuk basil yang dikenal dengan nama *Mycobacterium tuberculosis* dan menyerang berbagai organ atau jaringan tubuh. Penyakit TB menjadi masalah kesehatan masyarakat yang penting di dunia karena menyebabkan kematian terbesar, dengan angka kematian sebanyak 8.000 orang setiap hari dan 2-3 juta orang setiap tahunnya, sehingga pada tahun 1992 WHO mencanangkan tuberkulosis sebagai *Global Emergency* (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2006; Soedarto, 2009).

Penularan penyakit TB paru melalui perantaraan ludah atau dahak penderita TB paru yang

mengandung BTA. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* masuk ke paru secara inhalasi udara melalui sistem pernafasan, melalui hidung masuk ke laring kemudian ke trahea dan masuk ke paru melalui percabangan bronkiolus hingga ke alveolu, sehingga bakteri menetap secara dorman di jaringan alveolus karena mengandung banyak oksigen sebagai bahan dalam perkembangbiakan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan sebagai akibatnya bila bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menimbul di paru maka penderita reflex untuk batuk dan bakteri terseprot keluar dari mulut akibat batuk dan bersin. Hal ini yang menyebabkan penyebaran TB paru kepada orang lain disekitar penderita tidak dapat dihindarkan (Depkes RI. 1995; Kusnindar, 1990).

WHO melaporkan bahwa jumlah kematian terbesar akibat TB paru berada di Asia tenggara yaitu sebanyak 625.000 orang atau angka kematian sebesar 39 orang per 100.000 penduduk dan pada tahun 2002 WHO melaporkan bahwa terdapat 3,9 juta kasus TB paru dengan BTA (Basil Tahan Asam) positif. Pada tahun 2006 WHO menetapkan Indonesia sebagai negara dengan kasus TB terbesar nomor tiga di dunia setelah India dan Cina, dengan jumlah kasus baru sekitar 539.000 jiwa per tahun, sedangkan pada tahun 2009 Indonesia menduduki peringkat kelima di dunia setelah India, Cina, South Afrika dan Nigeria, dengan jumlah prevalensi 285/100.000 penduduk (Depkes R.I, 2002).

Di provinsi Nusa Tenggara Barat ditemukan sebanyak 3.000 kasus kasus TB paru dengan BTA positif setiap tahunnya, dengan angka kematian sebanyak 130 orang. Sesuai hasil survei prevalensi TB paru dengan estimasi insidensi kasus TB paru BTA positif adalah 210 kasus per 100.000 penduduk (Dikes Provinsi NTB, 2010).

Diagnosis penderita yang terindikasi TB paru dapat dilakukan melalui pemeriksaan laboratorium dengan pemeriksaan mikroskopis sediaan sputum, dimana pemeriksaan sediaan sputum untuk TB paru harus dilaksanakan oleh laboratorium yang terjalin dalam suatu jejaring pelayanan laboratorium TB paru. Pemeriksaan mikroskopis sediaan sputum penderita TB dapat dilakukan dengan metode Ziehl Neelsen menggunakan pewarna carbol fuchsin konsentrasi 0,3%, dimana konsentrasi tersebut merupakan standar untuk pemeriksaan mikroskopis TB. Kriteria penilaian sediaan berdasarkan rekomendasi WHO dengan menghitung

jumlah BTA yang meliputi : negatif, scanty, 1+, 2+ dan 3+ menggunakan skala IUATLD (International Union Against Tuberculosis And Lung Disease), sedangkan khusus sediaan 2+ harus diperiksa sebanyak 50 kali dan setiap ditemukan 1-10 BTA (Depkes RI, 2001; Dirjen Pelayanan Medik 2004; IUATLD, 1998; Ricard, 2004).

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul. Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* sangat kompleks, terdiri dari lapisan lemak yang cukup tinggi (60%) dan polisakarida seperti arabinogalaktan dan arabinomanan. Struktur dinding sel yang kompleks tersebut menyebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai maka zat warna tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan asam-alkohol. Intensitas warna merah yang tetap tahan menjadi penyebab utama *error rate* yang tinggi pada laboratorium pemeriksa sediaan hapusan sputum ditingkat kecamatan yaitu laboratorium puskesmas dan juga ditingkat kabupaten yaitu laboratorium rumah sakit. Untuk uji ketepatan dan ketelitian mutu pemeriksaan, maka sediaan hapusan sputum tersebut harus di periksa ulang oleh laboratorium yang ditunjuk pemerintah. Penurunan intensitas warna atau hilangnya warna merah hasil pewarnaan Ziehl Neelsen pada sediaan hapusan sputum dapat disebabkan karena lamanya waktu pengiriman sediaan sputum ke laboratorium yang ditunjuk oleh pemerintah untuk melakukan pemeriksaan ulang sehingga sesuai dengan program pemerintah dalam

penanggulangan TB paru yang menetapkan bahwa kesalahan pemeriksaan laboratorium tidak boleh lebih dari 5% (Aditama T.Y and Luthni E. 2002; Depkes R.I, 2002; GERDUNAS TB, 1999).

Berdasarkan uraian tersebut, untuk mengurangi *error rate* yang tinggi pada laboratorium pemeriksa sediaan hapusan sputum baik ditingkat Kecamatan maupun ditingkat Kabupaten, maka perlu dilakukan penelitian tentang konsentrasi carbol fuchsin dan waktu penyimpanan sediaan sputum 2+ hasil pewarnaan Ziehl Neelsen, dimana konsentasi yang digunakan adalah 0,3%, 1% dan 2%, sehingga didapatkan formula pewarna Ziehl Neelsen yang tepat untuk mempermudah interpretasi mikroskopis BTA (JRNTCP, 1997). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi carbol fuchsin dan waktu penyimpanan yang efektif pada sediaan hapusan sputum 2+ hasil pewarnaan Ziehl Neelsen, serta menganalisis perbedaan masing-masing konsentrasi dan waktu penyimpan, sehingga penelitian ini dapat bermanfaat bagi laboratorium pemeriksa TB untuk mengurangi kesalahan-kesalahan petugas laboratorium pada pemeriksaan sampel sputum penderita TB.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dilaboratorium, yang dilakukan pada bulan Januari sampai Juni 2010. Pada penelitian ini zat warna carbol fuchsin yang digunakan pada pewarnaan Ziehl Nellsen yang digunakan untuk mewarnai sediaan hapusan sputum 2+ konsentrasinya dibedakan menjadi tiga konsentrasi yaitu konsentrasi 0,3%, konsentrasi 1% dan konsentrasi 2%, sedangkan

pembacaan hasil sediaan hapusan sputum 2+ tersebut dibedakan menjadi sediaan hapusan sputum 2+ yang disimpan selama 0 bulan, 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan.

Sampel dari penelitian ini adalah sputum penderita TB yang menunjukkan hasil BTA 2+ berdasarkan pemeriksaan mikroskopis di Puskesmas Kediri tahun 2010. Pengambilan sampel sputum dilakukan pada pagi hari selama 2 hari dan sewaktu. Dipilih sputum yang mucopurulen. Sampel sputum yang sudah terkumpul disimpan pada suhu 2-8°C. Bahan dan alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pewarna Ziehl Neelsen yang terdiri dari Carbol Fuchsin, asam alkohol 3%, methilene blue 0,3%, obyek glass, ose, botol kaca transparan tempat pasir alkohol sebagai densifektan, pot sputum, lampu spiritus dan mikroskop cahaya.

Sampel sputum yang sudah diambil dari penderita, kemudian dibuat sediaan dengan menggunakan ose dan dikeringkan. Sediaan tersebut selanjutnya ditetesi dengan carbol fuchsin dengan konsentrasi 0,3%, 1% dan 2%, kemudian dipanaskan diatas nyala api spiritus sampai menguap tetapi zat warna tidak boleh mendidih atau kering dan didiamkan selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air kran. Selanjutnya sediaan ditetesi dengan asam alkohol sampai warna merah hilang dan dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya sediaan ditetesi dengan methylene blue 0,3% selama 15 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Sediaan hapusan sputum yang sudah kering diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dan ditambahkan minyak imersi tanpa menyentuh sediaan untuk mencegah

transfer BTA antar sediaan. Pembacaan sediaan berdasarkan Standart Internasional Unit Against Tuberculosis (IUAT), dengan cara dilakukan pemeriksaan BTA bentuk batang dan berwarna merah sebanyak 100 lapang pandang mikroskop. Selanjutnya sediaan hapusan sputum yang sudah diperiksa disimpan selama 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan, dimana pada masing-masing waktu penyimpanan sediaan hapusan sputum 2+ tersebut juga diperiksa secara mikroskopis untuk melihat intensitas warna BTA. Data yang didapatkan selama penelitian dianalisis secara statistik menggunakan

Rancangan Acak Kelompok dan dilanjutkan dengan uji beda rata-rata.

HASIL PENELITIAN

Dari hasil pemeriksaan sediaan hapusan sputum 2+ secara mikroskopis berdasarkan masing-masing konsentrasi carbol fuchsin yaitu konsentrasi 0,3%, 1% dan 2% dan waktu penyimpanan sediaan hapusan sputum 2+, yang dikelompokkan menjadi penyimpanan selama 0 bulan, 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah BTA Pada Sediaan Sputum Berdasarkan Konsentrasi Carbol Fuchsin Dan Lama Penyimpanan Sediaan Hapusan Sputum 2+.

Lama Penyimpanan (bulan)	Sediaan	Jumlah BTA yang didapat Pada konsentrasi carbol fuchsin (%)		
		0,3	1	2
0	1	40	73	8
	2	35	67	3
	3	33	63	2
	4	34	53	3
	Total Rerata	142	256	16
1	1	32	64	2
	2	27	50	1
	3	26	39	2
	4	26	66	1
	Total Rerata	111	219	6
2	1	18	66	0
	2	20	59	0
	3	17	46	0
	4	15	38	0
	Total Rerata	70	209	0
3	1	10	39	0
	2	8	48	0
	3	9	40	0
	4	9	49	0
	Total Rerata	36	176	0

Berdasarkan hasil pemeriksaan mikroskopis diketahui bahwa jumlah rerata BTA berdasarkan konsentrasi carbol fuchsin yang digunakan pada saat pewarnaan sediaan hapusan sputum 2+, yaitu

konsentrasi 0,3%, 1% dan 2% dapat dilihat pada table 2.

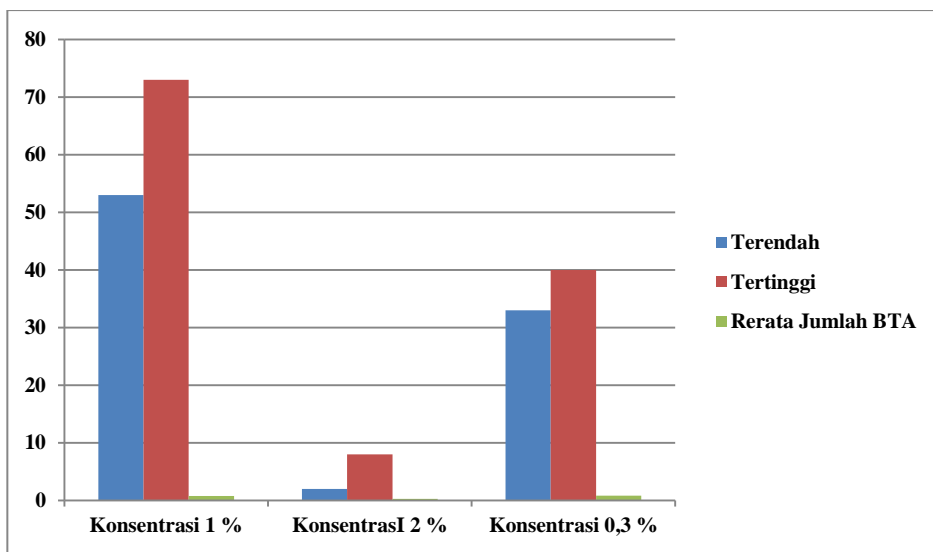
Tabel 2. Jumlah Rerata BTA Pada Sediaan Hapusan Sputum 2+ Berdasarkan Konsentrasi Zat Warna Carbol Fuchsin

Konsentrasi carbol fuchsin (%)	Jumlah rerata BTA
0,3	23
1	54
2	2

Tabel 2 menunjukkan bahwa konsentrasi carbol fuchsin yang menunjukkan jumlah rerata BTA tertinggi yaitu konsentrasi 1 % dengan jumlah rerata

BTA sebanyak 54, sedangkan jumlah rendah yaitu 2 BTA yang didapatkan dari hasil pewarnaan menggunakan carbol fuchsin konsentrasi 2%.

Perbandingan jumlah rerata BTA pada masing-masing konsentrasi carbol fuchsin yang digunakan pada waktu pewarnaan sediaan hapusan sputum 2+ , yaitu konsentrasi 0,3%, 1 dan 2% dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Grafik rerata jumlah BTA pada masing-masing konsentrasi carbol fuchsin

Untuk mengetahui kualitas sediaan hapusan sputum, setelah dilakukan pemeriksaan mikroskopis, selanjutnya sediaan hapusan sputum 2+ disimpan selama 1 bulan, 2 bulan sampai 3 bulan, sehingga didapatkan jumlah rerata BTA yang berbeda-beda seperti terlihat pada tabel 3

Tabel 3. Jumlah Rerata BTA Pada Sediaan Hapusan Sputum 2+ Berdasarkan Waktu Penyimpanan Sediaan Hapusan Sputum

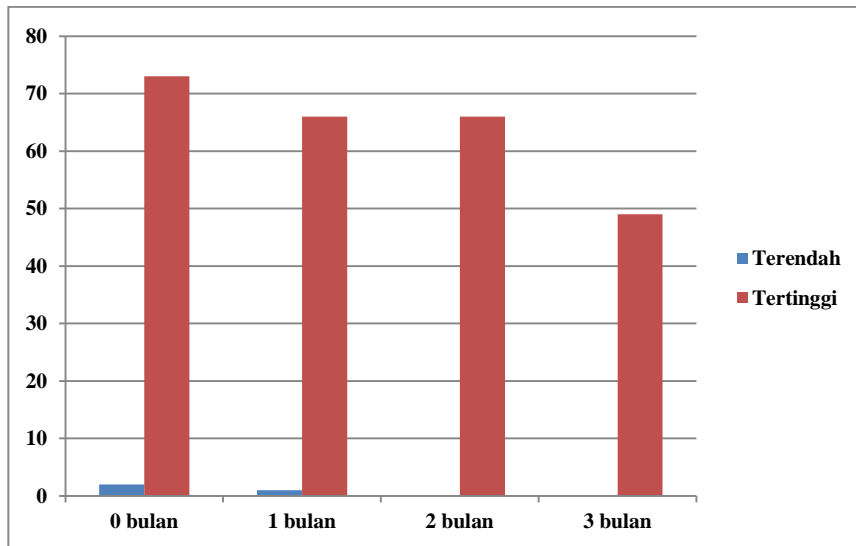
Waktu penyimpanan (bulan)	Jumlah rerata BTA
0	34
1	28
2	23
3	18

Pada tabel 3 menunjukkan bahwa penyimpanan sediaan sputum 2+ yang dilakukan selama tiga bulan menunjukkan jumlah BTA yang berbeda-beda, dimana jumlah BTA tertinggi didapatkan pada sediaan hapusan sputum yang disimpan selama nol bulan yaitu 34 BTA dan jumlah BTA terendah didapatkan pada sediaan hapusan sputum yang disimpan selama 3 bulan.

Penyimpanan sediaan hapusan sputum selama tiga bulan untuk semua konsentrasi carbol fuchsin, yaitu konsentrasi 0,3%, 1% dan 2% berpengaruh terhadap jumlah BTA, seperti yang

terlihat pada gambar 2, dimana pada penyimpanan sediaan hapusan sputum selama 0 bulan didapatkan hasil BTA tertinggi yaitu 34 BTA, sedangkan jumlah BTA terendah yaitu 18 BTA yang didapatkan dari

sediaan hapusan sputum yang disimpan selama 3 bulan. Penurunan jumlah BTA pada masing-masing waktu penyimpanan dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Grafik Rerata Jumlah BTA Pada Masing-masing Waktu Penyimpanan Sediaan Hapusan Sputum 2+

PEMBAHASAN

Berdasarkan Tabel 1, diketahui bahwa jumlah BTA pada sediaan hapusan sputum 2+ yang diwarnai menggunakan carbol fuchsin dengan konsentrasi 0,3%, 1% dan 2% menunjukkan jumlah yang berbeda-beda. Perbedaan jumlah BTA pada masing-masing konsentrasi carbol fuchsin menunjukkan bahwa jumlah rerata BTA tertinggi didapatkan dari hasil pewarnaan menggunakan carbol fuchsin konsentrasi 1%, yaitu 54 BTA, sedangkan jumlah rerata BTA terendah didapatkan dari hasil pewarnaan dengan carbol fuchsin konsentrasi 2%, yaitu antara 2 BTA.

Adanya perbedaan rerata jumlah BTA yang diwarnai dengan carbol fuchsin konsentrasi 0,3%, 1% dan 2% tersebut dapat disebabkan oleh

Mycobacterium tuberculosis mempunyai dinding sel yang sangat kompleks dan mempunyai lapisan lemak yang cukup tinggi (60%), sehingga pada waktu dilakukan pewarnaan dengan carbol fuchsin konsentrasi 0,3%, *Mycobacterium tuberculosis* tidak menyerap carbol fuchsin dan hasil pengamatan secara mikroskopis, jumlah BTA mengalami penurunan. Pada konsentrasi carbol fuchsin 1%, jumlah *Mycobacterium tuberculosis* tidak mengalami penurunan karena *Mycobacterium tuberculosis* menyerap carbol fuchsin dengan baik dan *Mycobacterium tuberculosis* juga bersifat tahan asam, yang berarti jika sekali diwarnai maka zat warna tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan asam-alkohol (Jawet, 1996; IUATLD, 1998).

Perbedaan jumlah BTA yang terlihat pada masing-masing konsentrasi carbol fuchsin menunjukkan bahwa konsentrasi carbol fuchsin yang paling efektif dapat menunjukkan jumlah BTA lebih tinggi adalah konsentrasi carbol fuchsin 1%, sedangkan yang digunakan secara nasional adalah konsentrasi carbol fuchsin 0,3%.

Pada Tabel. 3 terlihat perbedaan rerata jumlah BTA pada sediaan hapusan sputum 2+ yang disimpan selama 0 bulan, 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan, dimana semakin lama waktu penyimpanan, maka jumlah BTA pada sediaan hapusan sputum juga semakin berkurang. Hal ini disebabkan oleh penyimpanan yang lama membuat mutu sediaan hapusan sputum menjadi rusak atau zat warna menjadi luntur, sehingga pada saat pemeriksaan jumlah BTA pada sediaan hapusan sputum 2+ yang ditemukan menjadi berkurang.

Penyimpanan sediaan hapusan sputum yang dilakukan selama tiga bulan dengan konsentasi carbol fuchsin yang berbeda-beda menunjukkan bahwa jumlah BTA tertinggi terlihat pada awal penyimpanan dan semakin berkurang pada akhir penyimpanan yaitu sampai tiga bulan. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah BTA tidak mengalami penurunan yang drastis, sehingga dalam kondisi-kondisi tertentu laboratorium dapat menyimpan sediaan hapusan sputum dalam beberapa bulan, tetapi tidak boleh lebih dari tiga bulan.

Berdasarkan hasil analisis statistik metode perancangan percobaan Rancangan Acak Kelompok diperoleh nilai F hitung untuk waktu penyimpanan BTA = 6.04 > 4.76 untuk $\alpha = 5\%$ dengan $p = 0.03 < 0.05$ yang berarti bahwa waktu penyimpanan sediaan

hapusan sputum berpengaruh nyata terhadap jumlah BTA. Untuk konsentrasi carbol fuchsin diperoleh F hitung = 110.24 > 5.14 untuk $\alpha = 5\%$ dan 10.92 untuk $\alpha = 1\%$. Hal ini berarti faktor konsentrasi carbol fuchsin berpengaruh sangat nyata terhadap intensitas warna BTA yang diketahui melalui jumlah BTA yang diukur selama penelitian. Konsentrasi carbol fuchsin yang paling tinggi didapatkan BTA adalah konsentasi 1%, sedangkan jumlah BTA terendah didapatkan dari hasil pewarnaan menggunakan carbol fuchsin konsentrasi 2%. Perbedaan tersebut seharusnya menjadi bahan pertimbangan bagi pihak laboratorium pemeriksaan TB paru untuk meningkatkan konsentrasi carbol fuchsin yang digunakan untuk pewarnaan sediaan sputum sehingga tidak terjadi kesalahan-kesalahan pada pemeriksaan mikroskopis.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang didapat pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan :

1. Konsentrasi carbol fuchsin yang memberikan hasil pewarnaan BTA maksimal adalah konsentrasi 1%, sedangkan waktu penyimpanan sediaan sputum yang baik adalah kurang dari 1 bulan.
2. Hasil analisis statistik untuk konsentrasi carbol fuchsin 0,3% dibandingkan dengan konsentasi 1% berbeda nyata dengan nilai $p < 0.05$, sedangkan pada waktu penyimpanan sediaan hapusan sputum 2+ selama 0 bulan, 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan terdapat perbedaan yang nyata dengan nilai $p < 0.05$.

Saran

1. Untuk pemeriksaan mikroskopis sediaan hapusan sputum metode Ziehl Neelsen sebaiknya menggunakan carbol fuchsin konsentrasi 1% dan penyimpanan sediaan hapusan sputum tidak lebih dari 3 bulan.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjut pada sediaan hapusan sputum 1+, 3+ dan 4+ dengan jumlah sampel sputum yang lebih banyak.
3. Bagi petus laboratorium : untuk menemukan jumlah BTA yang seharusnya supaya memperhatikan bahan baku pewarna Ziehl-Neelsen, cara pembuatan dan pewarnaan sediaan hapusan sputum dan cara pembacaan hasil.
4. Untuk diagnosis penyakit TB paru perlu dilakukan pemeriksaan penunjang lain selain pemeriksaan mikroskopis sediaan hapusan sputum.

DAFTAR PUSTAKA

- Bobak, LM, Lowdermilk, DL, & Jensen, M.D Aditama T.Y and Luthni E. 2002. Buku petunjuk teknik pemeriksaan laboratorium tuberkulosis, edisi 2. Laboratoirum Mikrobiologi RS Persahabatan dan WHO Center for Tuberculosis. Jakarta.
- Depkes RI. 1995. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) .
- Depkes RI. 2001. *Buku Petunjuk Praktis Bagi Petugas Dan Pelaksana Penanggulangan TBC Di Unit Pelayanan Kesehatan*. Jakarta.
- Depkes RI. 2002. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberculosis*, Cetakan ke-8. Jakarta.
- Dinas Kesehatan Provinsi NTB. 2010. *Laporan Evaluasi Kegiatan TB Paru Provinsi NTB*. Bidang P2 Dinas Kesehatan Provinsi NTB. Mataram.
- Direktorat Jendral Pelayanan Medik. 2004. *Konsentrasi Reagen Ziehl Neelsen*. Direktorat Jendral Pelayanan Medik Depkes RI. Jakarta.
- Gerakan Terpadu Nasional Penanggulangan Tuberculosis (GERDUNAS TB). 1999. *Stop TB Dengan DOTS*. Jakarta.
- International Union Againt Tuberculosis And Lung Disease, 1998. *The Public Health Service Nattional Tuberculosis Reference Laboratory And The National Laboratory Network*, Minimum Requirements. Role and Operation In a Low Income Country; IUATLD.
- Jawet, M and Adelberg, 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kusnindar, 1990. Masalah Penyakit tuberkulosis dan pemberantasannya di Indonesia. *Cermin Dunia Kedokteran*, No. 63.
- Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2006. *Tuberkulosis, Pedoman Diagnosis Dan Penatalaksanaan Di Indonesia*. Jakarta.
- Revised National Tuberculosis Control Programe (RNTCP). 1997. *Manual For Laboratoty Technicens, Central TB Division*. Directorated General Of Health Services Ministry Of Health And Family Welfare Nirman, Bhavan New Delhi 110011.
- Ricard Lumb, Gunawan Yamin, Ivan Bastian, 2004. *Buku Pedoman Diagnosis Tuberkulosis Secara Laboratorium Dengan Pemeriksaan Mikroskopis Dahak*. Australian Government AUSAID.
- Soedarto. 2009. *Penyakit Menular Di Indonesia*. Penerbit Sagung Seto. Jakarta.