

## DESAIN DNA *PRIMER* SECARA *IN SILICO* SEBAGAI PENDETEKSI MUTASI GEN *gyrA* *Mycobacterium tuberculosis* UNTUK METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Luh Vida Sasmitha<sup>1</sup>, Putu Sanna Yustiantara<sup>1,2</sup> dan Sagung Chandra Yowani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia, 80361  
[sasmithavida@gmail.com](mailto:sasmithavida@gmail.com)

<sup>2</sup>Kelompok Studi MDR-TB & XDR-TB, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran,  
Bali-Indonesia, 80361  
[putyustiantara@yahoo.com](mailto:putyustiantara@yahoo.com)  
[cyowani@gmail.com](mailto:cyowani@gmail.com)

**ABSTRAK:** Penelitian ini bertujuan untuk mendesain DNA primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *gyrA* dengan metode PCR. Gen *gyrA* bertanggung jawab dalam resistensi fluorokuinolon yang merupakan inti regimen dari MDR-TB. Resistensi fluorokuinolon merupakan penanda terjadinya *Extensively Drugs Resistance Tuberculosis* (XDR-TB). XDR-TB merupakan tuberkulosis yang terjadi akibat adanya resistensi terhadap isoniazid, rifampisin dan fluorokuinolon serta terhadap salah satu obat anti tuberkulosis lini kedua dalam bentuk injeksi (amikasin, kanamisin dan kapreomisin). Pada penelitian ini desain primer dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan program *Clone Manager Suite 6* (University of Groningen). Urutan nukleotida gen *gyrA* *Mycobacterium tuberculosis* yang digunakan sebagai cetakan (*template*) diakses dari website [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (GenBank : AL123456.3). Primer dipilih berdasarkan kriteria dari *Clone Manager Suite 6* (University of Groningen), meliputi: panjang primer, %GC, Tm (*melting temperature*), stabilitas, *repeats*, *runs*, interaksi primer (*dimers* dan *hairpins*) dan *false priming*. Hasil penelitian mendapatkan sepasang primer dengan panjang masing-masing 19 basa, yaitu primer *forward* 5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3' (3-S1) dan primer *reverse* 5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC-3' (4-S1). Pasangan primer ini mampu mengamplifikasi sekuens gen *gyrA* sebesar 320 pb (nukleotida 90-380) dengan kondisi PCR pada suhu 95°C selama 15 menit untuk proses predenaturasi, diikuti 40 siklus amplifikasi (denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada 58°C selama 1 menit 20 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 2 menit) serta proses elongasi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 10 menit.

*Kata kunci:* Primer, *in silico*, *gyrA*, PCR

**ABSTRACT:** The aim of this study is to design DNA primer that amplifying *gyrA* gene using PCR method. The *gyrA* gene is responsible to fluoroquinolone resistance which is the main drug of MDR-TB regimen. Fluoroquinolone resistance is marker of Extensively Drugs Resistance Tuberculosis (XDR-TB). XDR-TB is a type of tuberculosis (TB) that is resistant to at least isoniazid, rifampicin and fluoroquinolone and/or to second-line anti-tuberculosis drugs (amikacin, kanamycin and capreomycin). In this study, primer design were reconstruct *in silico* using *Clone Manager Suite 6* program (University of Groningen). Nucleotide sequence of *gyrA* accessed from [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (GenBank: AL123456.3). The primer was chosen based on the criteria of *Clone Manager Suite 6* (university of Groningen), including primer length, %GC, Tm (*melting temperature*), stability, repeats, runs, primer interaction (*dimers* and *hairpins*) and *false priming*. The result of this research were a pair of primers which each length is 19 bases, e.g. forward primer 5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3' and reverse primer 5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC 3'.

PCR product of these primers is 320 pb (nucleotide 90-380), in predenaturation at 95°C for 15 minutes and followed by 40 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 1 minutes, annealing at 58°C for 1 minutes 20 seconds, and extension at 72°C for 2 minutes) with final extension at 72°C for 10 minutes.

**Keyword:** Primer, *in silico*, *gyrA*, PCR

## 1. PENDAHULUAN

MDR-TB (Multidrug Resistance Tuberculosis) adalah tuberkulosis yang disebabkan oleh resistensi yang dialami oleh *Mycobacterium tuberculosis* terhadap setidaknya dua obat anti tuberkulosis (OAT) lini pertama yang efektif yaitu isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF) [1]. Di Indonesia, kasus MDR TB terjadi sebanyak 15.380 kasus pada tahun 2009 hingga triwulan kedua tahun 2015 [2]

*Network of Supranasional Reference Laboratories* melakukan survey yang menyatakan pada tahun 2000-2004 telah terjadi resistensi terhadap OAT lini kedua yang disebut dengan XDR-TB. Extensively Drugs Resistant Tuberculosis (XDR-TB) didefinisikan sebagai MDR-TB yang mengalami resistensi terhadap lebih dari 3 regimen dari total 6 regimen OAT [1]. XDR-TB merupakan tuberkulosis yang disebabkan oleh bakteri yang resisten terhadap INH dan RIF (MDR-TB) serta ditambah resistensi terhadap salah satu dari OAT lini kedua dalam bentuk injeksi (amikasin, kanamisin dan kapreomisin) dan fluorokuinolon [3]. WHO, 2016 menyebutkan bahwa telah terjadi sebanyak 7579 kasus *Extensivelydrug resistant Tuberculosis* (XDR-TB) pada 74 negara di tahun 2016. Pengobatan yang diberikan untuk pasien resistensi tuberkulosis khususnya strain XDR-TB sangat terbatas, selain itu sulitnya mendiagnosa pasien dengan XDR-TB juga menyebabkan terjadinya peningkatan kasus dari XDR-TB [4]

Fluorokuinolon merupakan obat yang paling penting diberikan kepada pasien yang telah mengalami MDR-TB, hal ini karena fluorokuinolon memberikan hasil terapi yang lebih baik dan memiliki toksisitas yang rendah dibandingkan

dengan kelompok obat anti tuberkulosis lini kedua lainnya [5]. Fluorokuinolon merupakan golongan antimikroba sintetik yang menghambat *gyrase* DNA dan topoisomerase IV disebagian besar spesies bakteri dan akan menyebabkan kematian sel bakteri (Mdluli and Ma, 2007). Mutasi pada daerah *gyrA* merupakan penentu terjadinya resistensi fluorokuinolon di *M. tuberculosis*. Mutasi pada *gyrA* terdeteksi sebanyak 25,1 % dari strain multidrug tuberculosis dari 81,5% isolat yang mengalami resistensi fluorkuinolon [6]

Daerah mutasi yang menyebabkan resistensi fluorokuinolon disebut daerah QRDR (*Quinolone resistance determining region*) yang terletak antara asam amino posisi 67 dan 106 [7]. *GyrA* merupakan sub-unit I dari *gyrase* DNA (DNA topoisomerase II). Mutasi pada daerah QRDR *gyrA* terjadi pada kodon 90, 91, 94 yang menyebabkan terjadinya resistensi terhadap fluorokuinolon [8]. Li, *et al.*, 2014 menyebutkan pada kodon 90 terjadi perubahan nukleotida GCG (Alanin) menjadi GTG (Valin) dan mutasi yang terjadi pada kodon 94 adalah GAC (Asam aspartat) menjadi GGC (Glisin) dan Asam aspartat (GAC) menjadi AAC (Asparagin).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan deteksi mutasi pada gen *inhA* dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) [9]. PCR memiliki keuntungan dapat menghasilkan jumlah *copy* DNA *template* yang sangat banyak dengan waktu yang singkat. Pada proses PCR diperlukan beberapa bahan yaitu *template* DNA, primer, dNTP, buffer, dan enzim *polymerase*. Keberhasilan dalam proses PCR tergantung dari primer yang digunakan, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan

gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA[10]. Dalam merancang dan menentukan primer terbaik diperlukan beberapa kriteria yang harus dipenuhi. Perancangan primer merupakan suatu langkah awal untuk memperoleh primer terbaik yang dapat digunakan dalam proses PCR. Perancangan primer ini menggunakan metode *in silico* berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dengan urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari database GenBank [10].

## 2. PERCOBAAN

### 2.1 Bahan dan Peralatan

#### Gen *gyrA M. tuberculosis*

Desain primer DNA dilakukan dengan memasukkan data sekuen *wild-type* sensitif gen *gyrA M. tuberculosis* yang diunduh dari database URL:// [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan kode Genbank: AL123456.3

#### Software

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain laptop dengan spesifikasi Windows 10 64 bit dan software *Clone Manager Suite 6* untuk mendesain serta menganalisis hasil rancangan primer DNA.

### 2.2 Metode

#### Tahapan Desain Primer

Berikut adalah tahapan yang dilakukan pada penelitian ini :

1. Menginstal program *Clone Manager Suite 6* pada perangkat komputer yang dimiliki
2. Mengunduh sekuen gen *gyrA* dari situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) dan menyimpannya dalam bentuk file *notepad*.
3. Membuka program *Clone Manager Suite 6*, kemudian pilih menu bar *primer* dan pilih *design*
4. Muncul kotak dialog untuk memasukkan sekuen yang telah diunduh sebelumnya. Masukkan sekuen gen *gyrA* yang telah

diunduh hingga muncul kotak dialog *design primer*

5. Kemudian pada kotak dialog *design primer* dimasukkan panjang primer *forward* dan *reverse* (19 basa); target region dilengkapi dengan posisi basa yang diinginkan untuk posisi awal dan akhir dari region target (90-360) lalu pilih *ok*.
6. Lalu akan muncul kotak dialog *rank* yang menunjukkan peringkat rekomendasi primer yang terbaik dari program *Clone Manager Suite 6*.
7. Langkah 3 – 6 dapat diulangi sehingga nantinya diperoleh primer yang terbaik sesuai dengan kriteria.

#### Amplifikasi Fragmen gen *gyrA* dengan teknik PCR

*Template* DNA yang digunakan adalah isolat klinis P154 dan P123 MDR-TB. PCR dikondisikan pada suhu pada suhu 95°C selama 15 menit untuk proses predenaturasi, diikuti 40 siklus amplifikasi dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, suhu annealing yaitu 58°C selama 1 menit 20 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 2 menit dan proses elongasi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 10 menit.

#### Deteksi Produk PCR

Produk PCR dideteksi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% b/v, pada tegangan 50 volt selama 70 menit.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan desain primer secara *in silico* menggunakan program *Clone Manager Suite 6* (University of Gorenigen). Primer ini merupakan primer yang akan digunakan pada proses amplifikasi pada gen *gyrA* isolat MDR-TB yang ada di Bali. Desain primer dilakukan dengan data sekuen DNA gen *gyrA M. tuberculosis* GenBank : AL123456.3 yang diperoleh melalui situs URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Primer didesain pada region 90 hingga 380 pb. Pemilihan region amplifikasi ini dilakukan

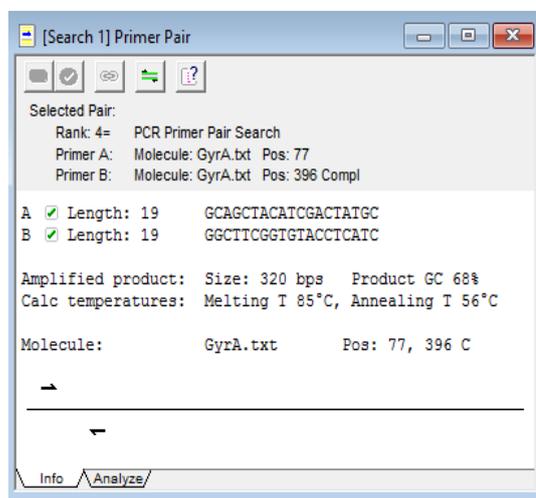
dengan tujuan untuk mencakup daerah yang telah mengalami mutasi pada penelitian sebelumnya yaitu pada kodon 90, 91 dan 94 [8]. Selanjutnya dimasukkan panjang primer dimulai dari 18-30 basa didasarkan pada pertimbangan kombinasi acak yang mungkin ditemukan pada satu urutan genom [10]. Jika primer yang dihasilkan memiliki panjang kurang dari 18 basa, primer akan mudah menyebabkan terjadinya *mispriming*. *Mispriming* adalah penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan [9]. Panjang primer lebih dari 30 basa tidak akan menunjukkan spesifitas yang lebih tinggi dan akan mengakibatkan terjadi proses hibridasi dengan primer lain sehingga akan menghambat terbentuknya polimerasi DNA [10]. Pada desain primer yang dilakukan panjang primer yang dipilih sepanjang 19 basa. *Program Clone Manager Suite 6* memberikan beberapa rekomendasi primer, kemudian dilakukan analisis pada masing-masing primer sehingga diperoleh primer terbaik untuk proses amplifikasi *gyrA*. Rekomendasi primer dari *Program Clone Manager Suite 6* ditunjukkan pada Gambar 1.

Rank	Position		GC %		Tm °C		Max Dimers	FPrim °C	Product Length
	A	B	A	B	A	B			
1	69	396	57	57	63	61	1 4	- -	328
2 =	70	396	57	57	65	61	2 4	1 -	327
2 =	75	396	52	57	61	61	2 4	- -	322
4 =	77	396	52	57	60	61	2 4	- -	320
4 =	74	396	52	57	62	61	2 4	- -	323
6	77	450	52	52	60	60	2 6	- 8	374
7	75	450	52	52	61	60	2 6	- 8	376
8 =	73	396	57	57	64	61	2 4	9 -	324
8 =	74	450	52	52	62	60	2 6	- 8	377
10	65	450	57	52	65	60	2 6	- 8	386
11	73	450	57	52	64	60	2 6	9 8	378

**Gambar 1.** Rekomendasi Primer dari *Program Clone Manager Suite 6*

Hasil yang diperoleh meliputi sepasang primer yang terdiri dari primer *forward* 5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3' dan primer *reverse* 5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC-3'.

Pasangan primer ini dapat mengamplifikasi sekuens gen *gyrA* sepanjang  $\pm 320$  pb. Berikut merupakan analisis hasil desain primer pada program *Clone Manager Suite 6* (Tabel 1). Dapat dilihat pada Gambar 2 bahwa primer yang di desain telah menghasilkan hasil yang sesuai dengan kriteria primer yang baik.



**Gambar 2.** Hasil design primer

Persentase GC yang dimiliki oleh primer *forward* sebesar 52% dan primer *reverse* sebesar 57%. Persentase GC yang baik berkisar antara 40-60%. Persentase GC adalah kandungan jumlah basa G (guanin) dan C (sitosin) yang dapat mempengaruhi Tm suatu primer, selain itu persentase GC juga mempengaruhi ikatan antar untai pada DNA. Kandungan GC tinggi akan mempersulit pemisahan rantai untai ganda pada primer dan *template* [9]. Suatu primer yang memiliki kandungan GC rendah tidak akan mampu untuk menempel secara efektif pada target sehingga akan terjadi penurunan efisiensi proses PCR.

Tm adalah suhu dimana 50% untai ganda DNA telah terpisah, nilai Tm yang direkomendasikan berkisar antara 50-65°C [6]. Tm pada sepasang primer ini adalah 60°C pada primer *forward* dan 61°C pada primer *reverse* dengan selisih suhu 1°C. Selisih Tm yang disarankan tidak lebih dari 5°C, apabila lebih tinggi akan

menyebabkan penurunan proses amplifikasi [10].

Tabel 4.1 Hasil Desain Primer untuk Amplifikasi Gen GyrA

Kriteria	3-S1	4-S1	Acuan pada Clone Manager Suite 6
Panjang	19	19	18-22
Persen (%) GC	52	57	50-60
Tm (°C)	60	61	55-80
Dimer pada ujung 3'	2	1	<3
Dimer selain ujung 3'	4	4	<7
Stabilitas (kcal)	1.9	1.8	≥1.2 kcal
Runs	1	2	<3
Repeats	Tidak ada	2	<3
Hairpins	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
False priming	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada

Keterangan:

Primer *forward* (3-S1):

5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3'

Primer *reverse* (4-S1):

5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC-3'

Hasil desain primer yang dilakukan memiliki dimer pada ujung 3' sebanyak 2 pb pada primer *forward* dan 1 pb pada primer *reverse*. Pasangan primer sebaiknya tidak terdapat dimer. Dimer ini akan mempengaruhi efisiensi proses penempelan pada target [9]. Pada *Clone Manager suite 6* batas toleransi dimer pada ujung 3' adalah <3 pb. Pasangan primer ini memiliki *dimers any* sebanyak 4 pasang basa pada primer *forward* dan *reverse*. *Dimers-any* adalah terjadinya dimer pada daerah selain 3'. *Dimers any* ini akan menyebabkan berkurangnya konsentrasi

primer yang dibutuhkan untuk proses amplifikasi [12]. Batas dimer pada daerah selain pada ujung 3' adalah <7 pb.

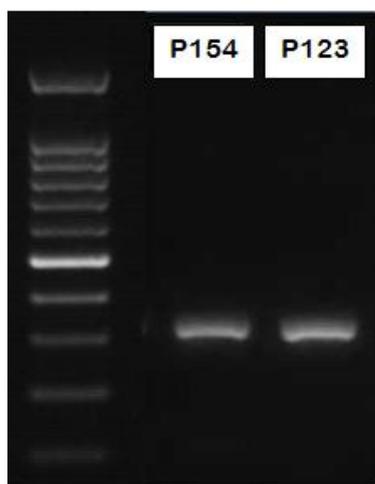
Stabilitas ujung 5' harus lebih besar dibandingkan dengan stabilitas ujung 3'. Hal ini akan mempengaruhi efisiensi dari proses penempelan dan pemanjangan primer. Stabilitas pada ujung 3' lebih tinggi dari 5' akan menyebabkan terjadinya *false priming* [13,14]. Batas stabilitas yang dipersyaratkan oleh *Clone Manager Suite 6* adalah ≥ 1,2 kcal. Primer yang dihasilkan memiliki stabilitas sebesar 1,9 dan 1,8 kcal sehingga telah memenuhi kriteria

Primer yang dihasilkan memiliki *runs* sebanyak 1 pb pada primer *forward* dan 2 pb pada primer *reverse*. *Runs* dan *repeats* maksimal terjadi pada 4 pasang basa [2]. *Runs* dan *repeats* yang dimiliki primer akan menyebabkan terjadinya *false priming*, sehingga pengulangan basa ini harus dihindari. *False priming* atau kesalahan penempelan primer di luar suhu *annealing* dapat mengakibatkan terjadinya kesalahan pembentukan produk pada suhu tertentu sehingga produk yang diperoleh tidak sesuai dengan hasil yang diinginkan [10]. Hal lain yang harus dihindari adalah kondisi *hairpin*. *Hairpins* adalah kondisi dimana ujung-ujung primer saling berkomplemen. Interaksi *hairpins* pada primer tidak diperbolehkan sama sekali. Pada pasangan primer yang dihasilkan tidak terdapat kondisi *hairpin* maupun *false priming*.

Selanjutnya dilakukan amplifikasi terhadap pasangan primer yang dihasilkan melalui proses PCR dan deteksi produk PCR dengan teknik elektroforesis. PCR dikondisikan pada suhu 95°C selama 15 menit untuk proses pre-denaturasi, diikuti 40 siklus amplifikasi (denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, suhu *annealing* yaitu 58°C selama 1 menit 20 detik, *elongasi* pada suhu 72°C selama 2 menit) dan proses *elongasi* akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 10 menit. DNA templat yang digunakan adalah P154 dan P123 M.

*Multidrug Resistance Tuberculosis.* Kemudian dilakukan proses deteksi produk PCR dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% dengan tegangan 50 volt selama 70 menit. Hasil yang diperoleh berupa elektroforegram yang ditunjukkan pada Gambar 3.

Hasil dari elektroforegram menunjukkan bahwa primer 3-S1 dan 4-S1 telah berhasil mengamplifikasi gen *gyrA* pada isolat MDR-TB dengan ukuran produk  $\pm 320$  pb sesuai dengan hasil analisis secara *in silico*.



**Gambar 3.** Hasil elektroforesis isolat P154 dan P123

#### 4. KESIMPULAN

1. Desain primer yang dibuat secara *in silico* menghasilkan primer terbaik yaitu primer *forward* 5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3' (3-S1) dan primer *reverse* 5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC 3' (4-S1)
2. Pasangan primer berhasil mengamplifikasi daerah gen *gyrA* dengan ukuran  $\pm 320$  pb sesuai dengan hasil analisis secara *in silico* yang dihasilkan pada program *Clone Manager Suite 6*

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Shah, S., *et al.* 2007. Worldwide Emergence of Extensively Drug-resistant Tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (3): 380-387
- [2] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Infodatin: Tuberculosis Temukan Obati Sampai Sembuh*. Jakarta: Pusat Data Dan Informasi Kementerian Kesehatan RI
- [3] WHO, 2015. *Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB)*. World Health Organization. Tanggal Akses 4 Oktober 2016. Tanggal Terbit November 2015.
- [4] Extensively Drug-Resistant Tuberculosis As A Cause Of Death In Patients Co-Infected With Tuberculosis And HIV In A Rural Area Of South Africa. Available At: [www.TheLancet.com](http://www.TheLancet.com)
- [5] Caminero, J. A., G. Sotgiu., A. Zumla., G. B. Migliori. 2010. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Available At: [www.TheLancet.com](http://www.TheLancet.com)
- [6] WHO. 2012. *Incidences*. Global Tuberculosis Report 2012. Available At: [Http://Www.Who.Int/Tuberculosis](http://Www.Who.Int/Tuberculosis). (Cited October 3, 2016).
- [7] Hooper, D. C. 2003. Mechanisms Of Quinolone Resistance. *Quinolone Antimicrobial Agents, 3rd Ed.* Washington, D.C: ASM Press
- [8] Devasia, R., A. Blackman, S. Eden, H. Li, F. Maruri, A. Shintani, C. Alexander, A. Kaiga, C. W. Stratton, J. Warkentin, Y. Tang, And T. R. Sterling. 2011. High Proportion Of Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates With Novel Gyrase Polymorphisms And A *GyrA* Region Associated With Fluoroquinolone Susceptibility. *Journal Of Clinical Microbiology*. P. 1390-1396
- [9] Maitri, L. K. B., I. N. Wirajana., S. C., Yowani, 2016. Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen *Inha* Isolat 134 *Multidrug Resistance*

- Tuberculosis (Mdr-Tb) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction. Cakra Kimia. Vol 3 No 2: 89-95*
- [10] Handoyo, D. Dan A. Rudiretna. 2000. Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) (General Principles And Implementation Of Polymerase Chain Reaction). *Unitas*. Vol. 9 (1) : 17-29.
- [11] Sasmito, D. E.K., Rahadian, K., Izzati, Muhimmah. 2014. *Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review*. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V: Yogyakarta
- [12] Borah, P. 2011. Primer Designing For PCR. *Science Vision*. 11 (3): 134-136
- [13] Bartlett, J. M. S. And D. Stiring. 2003. *Methods In Molecular Biology. Vol. 226: PCR Protocols 2<sup>nd</sup> Editions*. Totowa, NJ: Human Press Inc. P. 81-604
- [14] Maitri, L. K. B., I. N. Wirajana., S. C., Yowani, 2016. Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen *Inha* Isolat 134 *Multidrug Resistance Tuberculosis* (MDR-Tb) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction. Cakra Kimia. Vol 3 No 2: 89-95*
- [15] Li, J., Xu. G., Tao, L., Jie, W., Gang, S., Qinyun, L., Yuan,J., Yangyi, Z., Jian, M., Qian, G. 2014. Association Of Gyra/B Mutations And Resistance Levels To Fluoroquinolones In Clinical Isolates Of Mycobacterium Tuberculosis. *Emerging Microbes And Infections*. 3 (19):1-5