

ANALISIS PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI PROMOTER *inhA* MULTIDRUG RESISTANCE TUBERCULOSIS (MDR-TB) DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

I Gusti Ayu Agung Septiari ^{1*}, Putu Sanna Yustiantara ^{1,2}, dan Sagung Chandra Yowani ^{1,2}

¹Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

²Kelompok Studi MDR-TB & XDR-TB, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

*Email : gung.ari71@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis beberapa pasangan primer dalam mengamplifikasi daerah promoter *inhA* secara *in silico* dan *in vitro*. Analisis primer secara *in silico* dilakukan menggunakan program *Clone Manger Suite 6*. Sekuen DNA templat yang digunakan dalam analisis primer diunduh dari situs www.ncbi.nlm.nih.gov dengan kode genbank : U66801.1 yang merupakan sekuens DNA gen *fabG* *M. tuberculosis* H37Rv. Deteksi primer secara *in vitro* dilakukan dengan teknik PCR menggunakan isolat P16 dan 86 *M. tuberculosis* MDR sebagai templat. Proses amplifikasi dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 15 menit, amplifikasi sebanyak 45 siklus (denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit 20 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 10 detik) serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Selanjutnya, deteksi produk PCR dilakukan dengan gel elektroforesis 1,5%. Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah, diperoleh pasangan primer *forward* (mabA-*inhA*-promoter-FS) dengan urutan sekuen 5'-ACATACCTGCTGCGCAAT-3' (18 nukleotida) dan primer *reverse* (mabA-*inhA*-promoter-R) dengan urutan sekuens 5'-CTCCGGTAACCAGGACTGAA-3' (20 nukleotida) (Chen *et al.*, 2011) yang memenuhi kriteria pasangan primer yang baik dilihat dari panjang primer, nilai Tm, %GC, stabilitas, jumlah *hairpins*, *dimers* dan *runs*. Dari deteksi secara *in vitro* sepasang primer tersebut juga telah mampu mengamplifikasi daerah promoter *inhA* sebesar 284 pb.

Kata kunci : Analisis primer, PCR, promoter *inhA*, *M. tuberculosis*, *in silico*, *in vitro*, *Clone Manager Suite 6*

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze several primary combinations for amplifying *inhA* promoter region by *in silico* and *in vitro* ways. Primary *in silico*'s analysis was done by *Clone Manager Suite 6* program. *fabG* gene sequence of *M. tuberculosis* was downloaded from www.ncbi.nlm.nih.gov (genbank: U66801.1) and used as DNA template. *In vitro* detection was done by PCR technique using P16 and 86 *M. tuberculosis* MDR isolates as DNA template. Amplification was done in described conditions: predenaturation at 95°C for 15 minutes, 45 cycle of amplication (denaturation on 94°C for 1 minute, *annealing* on 54°C for 1 minute 20 seconds dan extension on 72°C for 1 minute 10 seconds) and also post extension on 72°C for 10 minutes. PCR product was detected by agarose gel elektroforesis (1,5%). In conclusion, combination of primary *forward* (mabA-*inhA*-promoter-FS) 5'-ACATACCTGCTGCGCAAT-3' (18 nucleotide) and primary *reverse* (mabA-*inhA*-promoter-R) 5'-CTCCGGTAACCAGGACTGAA-3' (20 nucleotide) (Chen *et al.*, 2011) have met the good criteria of primary combination which was seen from several aspects such as: primary length, Tm value, %GC, stability, number of *hairpins*, *dimers* and *runs*. *In vitro* detection showed that the primary combination also amplified *inhA* promoter region with the length of 284 pb.

Keywords : Primer analysis, PCR, *inhA* promoter region, *M. tuberculosis*, *in silico*, *in vitro*, *Clone Manager Suite 6*

PENDAHULUAN

Salah satu masalah kesehatan utama yang masih dihadapi dunia adalah penyakit tuberkulosis (TB). TB merupakan penyakit infeksi dengan tingkat mortalitas yang tinggi. Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO), pada tahun 2011 terjadi 1,4 juta kematian karena TB di seluruh dunia (WHO, 2012).

Usaha dalam menurunkan angka kejadian TB menghadapi tantangan baru dengan munculnya fenomena *Multi Drug Resistance-Tuberculosis* (MDR-TB). MDR-TB merupakan TB yang disebabkan oleh bakteri yang resisten terhadap setidaknya isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF) (WHO, 2012). Isoniazid (INH) merupakan OAT lini pertama yang termasuk dalam regimen standar pengobatan TB (Dipiro *et al.*, 2008). Terdapat beberapa penelitian sebelumnya yang telah mendeteksi adanya mutasi pada daerah promotor *inhA* penyebab resistensi terhadap INH dengan teknik PCR.

Salah satu komponen yang berperan penting dalam proses PCR adalah primer (Innis dan Gelfand, 1990). Primer akan membatasi fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Handoyo dan Ari, 2001). Sebelum digunakan dalam proses amplifikasi, perlu diperhatikan beberapa hal sehingga suatu primer dapat menempel secara efisien dan spesifik pada fragmen DNA target yang nantinya akan berpengaruh terhadap keberhasilan proses PCR. Pertimbangan tersebut meliputi, panjang primer, %GC, Tm, dimer pada ujung 3', stabilitas, jumlah *runs*, *repeats*, *hairpins* dan *false priming* (Bartlett dan Stirling, 2003; Borah, 2011). Perkembangan ilmu bioinformatika memungkinkan dilakukannya desain dan analisis primer. Penggunaan *software* merupakan salah satu hal yang identik dengan bioinformatika. Penggunaan *software* hanya merupakan suatu proses analisis secara *in silico* yang perlu diikuti dengan deteksi secara *in vitro* untuk mengukuhkan kemampuan suatu primer dalam menghasilkan produk melalui proses PCR dan visualisasi dengan gel elektroforesis. Penelitian ini menjadi bagian dari proses untuk mendeteksi adanya mutasi pada daerah promotor *inhA*. Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk menganalisis kombinasi pasangan primer

yang digunakan dalam proses PCR untuk mengamplifikasi daerah promotor *inhA*.

MATERI DAN METODE

Gen *fabG* (*mabA*) *M. tuberculosis* H37Rv

Gen *mabA* (*fabG*) *M. tuberculosis* H37Rv digunakan sebagai templat untuk menganalisa pasangan primer (kode genbank U66801.1) yang dapat diunduh pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov.

Primer

Terdapat beberapa pasangan primer yang diperoleh dari penelitian-penelitian sebelumnya yang selanjutnya akan dianalisis secara *in silico* menggunakan program *Clone Manager Suite 6* (*University of Groningen*).

Software dalam Analisis Primer

Pada penelitian ini dilakukan analisis primer secara *in silico* dengan menggunakan *software Clone Manager Suite 6* (*University of Groningen*).

Cara Kerja

Prosedur Kerja Software Clone Manager Suite 6 (*University of Groningen*)

Untuk melakukan analisis pasangan primer, langkah-langkah yang dilakukan adalah mengunduh sekuens gen *mabA* (*fabG*) pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov kemudian sekuens tersebut di-*copy*. Langkah selanjutnya adalah memasukkan sekuens gen *mabA* (*fabG*) dengan cara membuka program *Clone Manager Suite 6*. Pada *menu bar*, dipilih *menu File* klik *New* kemudian akan muncul kotak *Create New Molecule Wizard*, ditandai bagian *Paste Sequence*. Kemudian pada *menu bar* dipilih *menu Primer*, diklik *submenu Direct Entry* masukkan urutan nukleotida primer *forward* dan primer *reverse*. Setelah memasukkan urutan sekuens masing-masing primer selanjutnya diklik toolbar *Link to Molecule* untuk mengetahui daerah penempelan primer pada sekuens gen *mabA* (*fabG*). Untuk memperoleh hasil analisis pasangan primer tersebut, pilih kembali *menu Primer*, diklik *submenu Analyze* dan *Analyze Mix Wizard*.

Amplifikasi Daerah Promoter *inhA* dengan Teknik PCR

DNA templat yang digunakan untuk amplifikasi berasal dari DNA kromosomal yang diisolasi dari isolat P16 dan 86 *M. tuberculosis Multi Drug Resistance*. Kondisi PCR yang diaplikasikan adalah, denaturasi awal pada suhu 95°C selama 15 menit, amplifikasi sebanyak 45 siklus (denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit 20 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 10 detik) serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Deteksi Produk PCR

Produk PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa 1,5% b/v.

NCBI pada URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dengan kode genbank : U66801.1 dimasukkan ke dalam program *Clone Manager Suite 6*. Setelah itu dimasukkan beberapa sekuens primer yang akan dibandingkan dari hasil penelusuran pustaka (Morlock *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011). Kemudian dilakukan analisis terhadap beberapa pasangan primer tersebut. Analisis hasil perbandingan dari beberapa primer dapat dilihat pada Tabel 1. Primer yang relatif paling memenuhi kriteria dilihat dari panjang primer, nilai T_m , %GC, stabilitas, jumlah *hairpins*, *dimers* dan *runs* adalah primer *forward* (mabA-*inhA*-promoter-FS) dengan urutan sekuens 5'-ACATACCTGCTGCGC AAT-3' (18 nukleotida) dan primer *reverse* (mabA-*inhA*-promoter-R) dengan urutan sekuens 5'-CTCCGGTAACCAGGACTGAA-3' (20 nukleotida) (Chen *et al.*, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data sekuens gen *mabA (fabG) M. tuberculosis H37Rv* yang diperoleh dari database

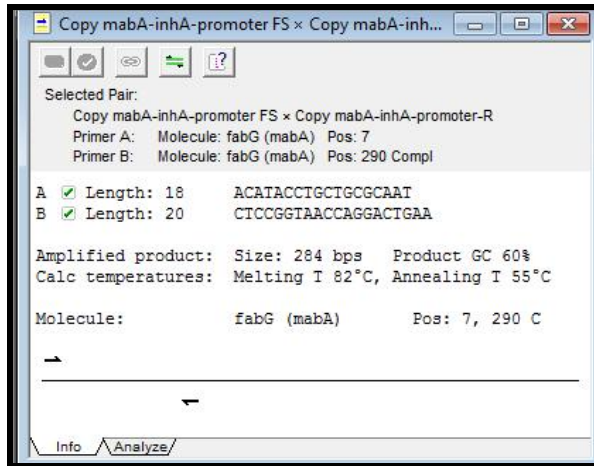
Tabel 1. Analisis Perbandingan Primer dengan Program *Clone Manager Suite 6* (University of Groningen)

Kriteria	Primer 1*		Primer 2*		Primer 3*		Acuan <i>Clone Manager Suite 6</i>
	Forward	Reverse	Forward	Reverse	Forward	Reverse	
Panjang Primer (pb)	18	20	20	20	21	21	Tidak ada
Persen GC (%GC)	50	55	65	65	52	52	50-60
T_m (°C)	61	62	68	69	65	63	55-80
Dimer pada ujung 3'	2	1	2	0	1	2	< 3
Stabilitas (kcal)	1,5	2,2	1	0,4	2	2,7	1,2
<i>Runs</i>	2	2	3	5	3	2	< 3
<i>Repeats</i>	2	Tidak ada	Tidak ada	2	Tidak ada	2	< 3
<i>Hairpins</i>	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
<i>False Priming</i> (°C)	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	17	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
Pustaka	(Chen <i>et al.</i> , 2011)		(Morlock <i>et al.</i> , 2003)		(Leung <i>et al.</i> , 2006)		

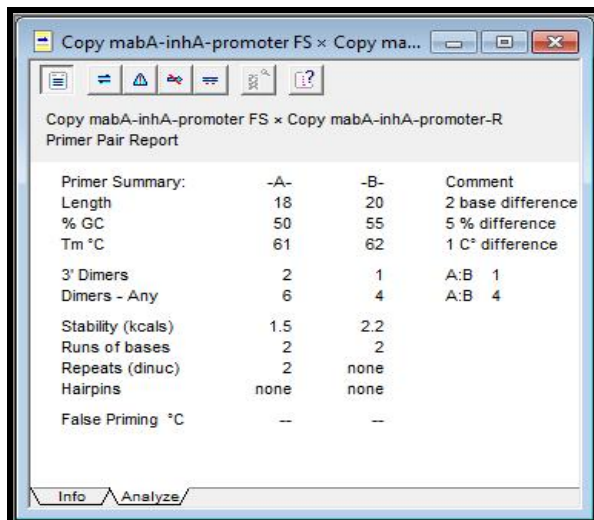
Keterangan:

- Primer 1*: Forward (mabA-*inhA*-promoter-FS): 5'-ACATACCTGCTGCGCAAT-3'
Reverse (mabA-*inhA*-promoter-R): 5'-CTCCGGTAACCAGGACTGAA-3'
- Primer 2*: Forward (*inhA*-1): 5'-CCTCGCTGCCAGAAAGGGA-3'
Reverse (*inhA*-2): 5'-ATCCCCGGTTTCCTCCGGT-3'
- Primer 3*: Forward (MabA-115F): 5'-ACAAACGTCACGAGCGTAACC-3'
Reverse (MabA+336R): 5'-GTTGGCGTTGATGACCTTCTC -3'

Hal ini terlihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Hasil Analisis Sekuens Pasangan Primer pada Program Clone Manager Suite 6



Gambar 2. Hasil Analisis Kriteria Pasangan Primer pada Program Clone Manager Suite 6

Dari hasil analisis yang telah dilakukan terlihat bahwa kedua primer telah memenuhi kriteria primer yang baik dilihat dari panjang primer seperti hasil yang ditunjukkan pada Gambar 1. Dimana secara berturut-turut primer *forward* (mabA-inhA-promoter-FS) dan primer *reverse*

(mabA-inhA-promoter-R) memiliki panjang 18 dan 20 nukleotida.

Menurut Innis dan Gelfand (1990), primer yang baik tersusun atas 18-28 nukleotida. Panjang minimal suatu primer adalah 18 nukleotida, jika lebih pendek akan mengakibatkan berkurangnya spesifisitas primer. Pada primer dengan ukuran yang pendek akan memungkinkan terjadinya *mispriming* (penempelan primer pada tempat lain yang tidak diinginkan) yang tinggi. Hal ini akan mempengaruhi efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan, primer dengan panjang lebih dari 30 nukleotida tidak akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna (Handoyo dan Ari, 2000).

Gambar 2 menunjukkan bahwa primer mabA-inhA-promoter-FS (*forward*) dan mabA-inhA-promoter-R (*reverse*) masing-masing memiliki nilai %GC 50% dan 55% dengan nilai *melting temperature* (T_m) masing-masing 61°C dan 62°C. Besarnya %GC suatu primer akan mempengaruhi nilai T_m dan T_a primer tersebut. Primer dengan panjang 18-28 nukleotida seharusnya memiliki %GC antara 50-60 % (Innis dan Gelfand, 1990).

Primer dengan nilai %GC yang tinggi akan memiliki nilai T_m yang tinggi pula karena terdapat lebih banyak ikatan hidrogen di dalamnya (3 ikatan hidrogen). Terdapat hubungan yang linear antara nilai %GC dengan nilai T_m dan T_a primer (Chen dan Janes, 2002). Pada kedua primer tersebut terdapat perbedaan nilai T_m sebesar 1°C, nilai ini masih dapat diterima didasarkan pada penelitian Barlett dan Stirling (2003) yang menyatakan nilai perbedaan T_m di antara dua primer yang diperbolehkan adalah 2-5 °C. Hal ini akan menjamin diperolehnya nilai T_a yang tepat untuk kedua primer (Bartlett dan Stirling, 2003).

Nilai T_m yang terlalu tinggi akan mengakibatkan terjadinya hibridisasi yang tidak adekuat antara primer dan templat dimana akan terbentuk ikatan yang terlalu kuat antara primer dengan DNA target sehingga produk PCR yang dihasilkan rendah namun lebih spesifik. Sedangkan nilai T_m yang terlalu rendah akan menyebabkan terbentuknya produk yang tidak spesifik karena tingginya penempelan primer pada daerah yang tidak tepat (*mismatches*) (Lee *et al.*, 1997; Borah, 2011). Menurut Burden dan Whitney (1995) untuk primer dengan panjang 18-22 nukleotida dan %GC 45-55°C umumnya memiliki rentang nilai T_m 55-

80 °C. Sehingga dapat disimpulkan bahwa primer yang akan digunakan telah memenuhi kriteria %GC dan T_m yang baik.

Dimers yang terjadi pada ujung 3' harus dihindari karena akan menyebabkan terjadinya pemanjangan primer PCR dengan menggunakan primer kedua sebagai templat yang nantinya membentuk struktur sekunder yang disebut dengan *primer-dimers*. Hal ini akan mengakibatkan primer kehilangan fungsinya sehingga amplikon yang dihasilkan akan berkurang jumlahnya (*Clone Manager Suite 6*). Dari hasil analisis *in silico* nilai *dimers* masing-masing primer telah memenuhi kriteria primer yang baik.

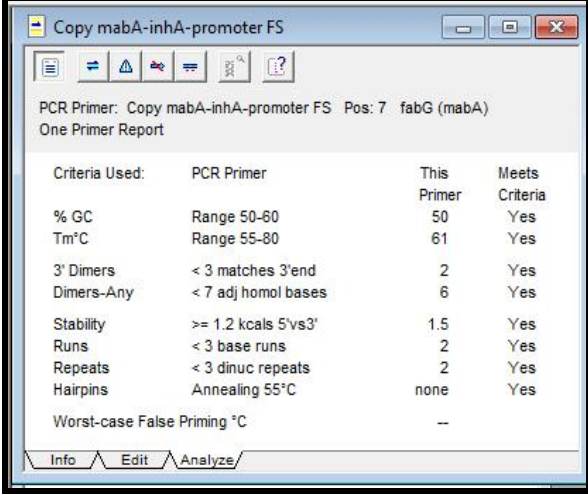
Kriteria lain yang harus dipenuhi oleh primer adalah dalam hal stabilitas. Parameter ini berkaitan dengan perbedaan nilai stabilitas antara ujung 5' dan 3' primer. Afinitas maksimal primer terhadap templatnya terdapat pada ujung 5' primer. Karenanya, ujung 3' primer hanya perlu berikatan secukupnya sehingga DNA polimerase dapat memulai replikasi.

Namun, jika ujung 3' primer mempunyai stabilitas termal yang tinggi, hal tersebut akan mengakibatkan terjadinya penempelan ujung 3' primer pada templat dan selanjutnya memulai replikasi, walaupun ujung 5' tidak cocok. Hal ini akan menyebabkan penurunan spesifisitas hibridisasi. Sehingga nilai stabilitas ujung 5' harus lebih besar dibandingkan ujung 3' (*Clone Manager Suite 6*). Dari hasil analisis *in silico* terhadap primer *mabA-inhA-promoter-FS* dan *mabA-inhA-promoter-R* dengan nilai stabilitas masing-masing sebesar 1,5 kcals dan 2,2 kcals. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua primer tersebut telah memenuhi kriteria stabilitas yang ditetapkan.

Hasil analisis terhadap kualitas masing-masing primer secara terpisah ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.

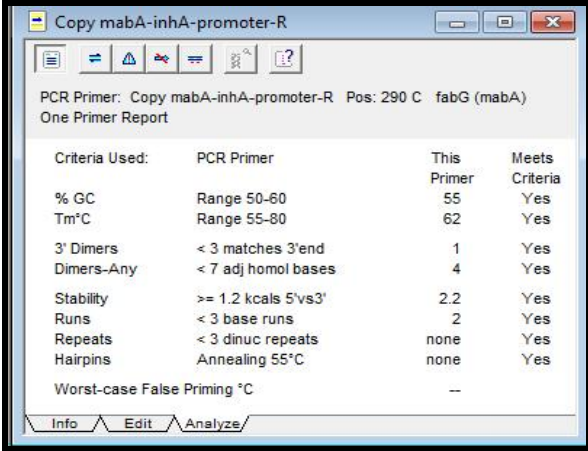
Gambar 3 dan 4 secara terpisah menunjukkan bahwa primer *forward* dan *reverse* tersebut telah memenuhi kriteria *runs*, *repeats* dan *hairpins* sesuai yang dipersyaratkan program *Clone Manager Suite 6* (*University of Groningen*) *Runs*, *repeats* dan *hairpins* merupakan struktur sekunder yang terbentuk akibat adanya interaksi intramolekular dan intermolekular. Struktur sekunder yang terbentuk ini akan mengurangi ketersediaan primer untuk berinteraksi dengan

templat target. Jumlah maksimal *runs* dan *repeats* yang diperbolehkan adalah 4 pb (Borah, 2011).



Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	50	Yes
T_m °C	Range 55-80	61	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	6	Yes
Stability	≥ 1.2 kcals 5'vs3'	1.5	Yes
Runs	< 3 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		--	

Gambar 3. Hasil Analisis Kualitas Primer *Forward* pada Program *Clone Manager Suite 6*



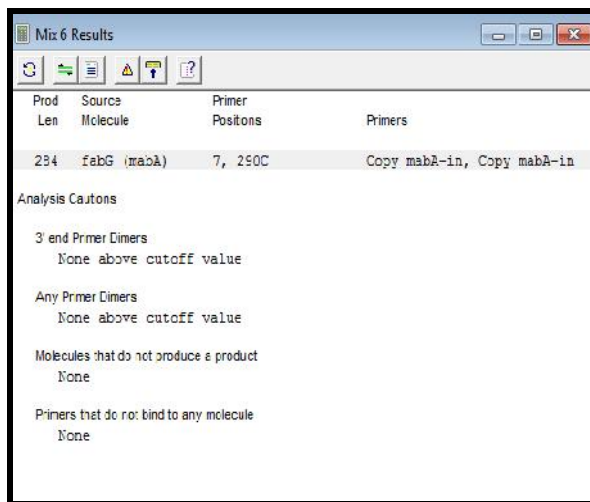
Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	55	Yes
T_m °C	Range 55-80	62	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	1	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	≥ 1.2 kcals 5'vs3'	2.2	Yes
Runs	< 3 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		--	

Gambar 4. Hasil Analisis Kualitas Primer *Reverse* pada Program *Clone Manager Suite 6*

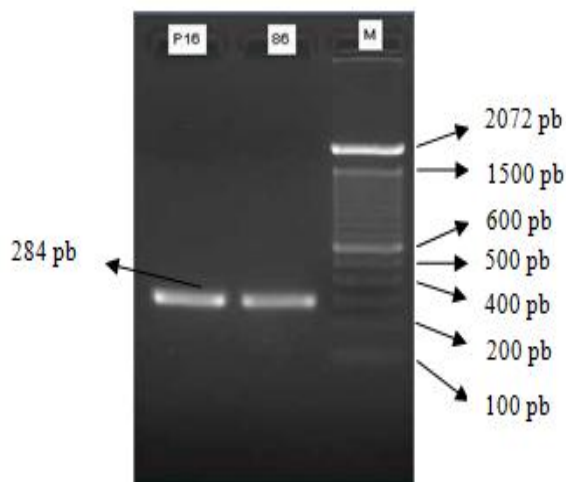
Kemudian dilakukan simulasi pada sepasang primer tersebut secara *in silico* dengan menggunakan *analyze mix wizard* dengan menggunakan gen *fabG (mabA)* *M. tuberculosis* sebagai DNA templat. Hasil analisis yang diperoleh terdapat pada Gambar 5.

Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa produk PCR (amplikon) yang akan dihasilkan memiliki ukuran 284 pb yang terletak

pada posisi nukleotida 7 sampai dengan 290. Berdasarkan studi pustaka dan acuan kriteria dari *Clone Manager Suite 6*, diperoleh kesimpulan bahwa secara keseluruhan primer yang akan digunakan telah memenuhi kriteria primer yang baik dan daerah target yang diharapkan.



Gambar 5. Hasil Analisis Sepasang Primer dengan gen *fabG (mabA)* sebagai DNA templat



Keterangan :

Marker DNA ladder 100 pb (M); isolat P16 (P16); isolat 86 (86).

Gambar 6. Elektroforegram amplifikasi fragmen promoter *inhA* isolat P16 dan 86 pada suhu *annealing* 54°C

Selain analisis *in silico*, dilakukan juga deteksi secara *in vitro* terhadap pasangan primer tersebut melalui proses PCR dan deteksi produk PCR dengan teknik elektroforesis gel agarosa 1,5%. Kondisi PCR yang diaplikasikan adalah, denaturasi awal pada suhu 95°C selama 15 menit, amplifikasi sebanyak 45 siklus (denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit 20 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 10 detik) serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. DNA templat yang digunakan berasal dari DNA kromosomal yang diisolasi dari isolat P16 dan 86 *M. tuberculosis Multi Drug Resistance*. Hasil yang diperoleh berupa elektroforegram yang diperlihatkan pada Gambar 6.

Hasil elektroforegram pada Gambar 6 menunjukkan bahwa primer *mabA-inhA-promoter-FS (forward)* dan *mabA-inhA-promoter-R (reverse)* telah berhasil mengamplifikasi daerah promoter *inhA* dengan ukuran produk 284 pb sesuai dengan hasil analisis secara *in silico*.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Primer *mabA-inhA-promoter-FS (forward)* dengan urutan nukleotida 5'-ACATACC TGCTGCGCAAT-3' dan primer *mabA-inhA-promoter-R (reverse)* 5'-CTCCGGT AACCAGGACTGAA-3' (Chen *et al.*, 2011) memenuhi kriteria primer yang baik dilihat dari panjang primer, %GC, T_m , dimer pada ujung 3', stabilitas, jumlah *runs*, *repeats*, *hairpins* dan *false priming*.
2. Pasangan primer berhasil mengamplifikasi daerah promoter *inhA* dan menghasilkan produk PCR (amplikon) dengan ukuran 284 pb sesuai dengan hasil analisis secara *in silico* pada program *Clone Manager Suite 6*.

Saran

Perlu dilakukan analisis lebih lanjut terhadap produk PCR (amplikon) dengan teknik sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida amplikon.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bartlett, J. M. S. dan Stirling, D., 2003, *Methods in Molecular Biology, Vol. 226 : PCR Protocols 2nd Editions*, Human Press Inc., Totowa, NJ, p. 81-604
- Borah, P., 2011, Primer Designing for PCR, *Science Vision*, 11 (3) : 134-136
- Burden, D.W. dan Whitney, D.B., 1995, *Biotechnology Proteins to PCR: Proteins to PCR : A Course in Strategies and Lab Technique*, Birkhauser, USA, p. 304
- Chen, B.Y. dan Janes, H. W. 2002. *Methods in Molecular Biology Vol. 192: PCR Cloning Protocols 2nd Edition*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 19-21
- Chen, X., Kong, F., Wang, Q., Li, C., Zhang, J., dan Gilbert, G.L., 2011, Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin, and Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using High-Resolution Melting Analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (10) : 3450–3457
- Dipiro J.T., Talbert, R.T., Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., dan Posey, L.M. Michael P., 2008, *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 7th Edition*, The McGraw Hill Companies Inc., United States of America, p. 1839-1854
- Handoyo, D. dan Ari, R., 2000, Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, *Unitas*, 9 (1) : 17-29
- Innis, M.A. dan Gelfand, D.H., 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc., London, UK, p. 3-11
- Lee, H. H., Morse, S.A., and Olsvik, Ø., 1997, *Nucleic Acid Amplification Technologies: Application to Disease Diagnosis*, Eaton Publishing, USA
- Leung, E. T. Y., Ho, P. L., Yuen, K. Y., Woo, W. L., Lam, T. H., Kao, R. Y., Seto, W. H dan Yam, W. C., 2006, Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a Novel Mutation in *inhA*, *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (3) : 1075-1078
- Machado, D., Perdigo, J., Ramos, J., Couto, I., Portugal, I., Ritter, C., Boettger E.C., dan Viveiros, M., 2013, High-level Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa Family is Associated with *inhA* Double Mutations, *Journal of Clinical Microbiology*, p. 1-5
- Morlock, G.P., Metchock, B., Sikes, D., Crawford, J.T., and Cooksey, R.C., 2003, *ethA*, *inhA*, and *katG* Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (12) : 3799-3805
- World Health Organization, 2012, *Global Tuberculosis Report 2012*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 1-66