

---

**JURNAL METAMORFOSA**  
*Journal of Biological Sciences*  
ISSN: 2302-5697  
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

---

**OPTIMASI DIGESTI ENZIM RESTRIKSI SacII PADA ISOLAT  
*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv UNTUK DETEKSI MUTASI PROMOTER *inhA*  
PADA KASUS MDR-TB DENGAN METODE PCR-RFLP**

**DIESTION OPTIMIZATION OF RESTRICTED ENZYME SacII ON  
*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ISOLATE FOR THE DETECTION OF  
PROMOTER MUTATION *inhA* ON MDR-TB CASE BY PCR-RFLP METHOD**

**Ida Ayu Ratih Dwi Nugraha Putri<sup>1\*</sup>, Sagung Chandra Yowani<sup>1,2</sup>, I Nengah Wirajana<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>*Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali*

<sup>2</sup>*Kelompok Studi MDR dan XDR-TB, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali*

<sup>3</sup>*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali*

*\*Email: ratihdwinugraha@gmail.com*

## INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi digesti enzim restriksi SacII pada isolat *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Enzim restriksi SacII dengan situs restriksi CCGC<sup>^</sup>GG diketahui dapat digunakan untuk mendeteksi adanya perubahan nukleotida akibat mutasi pada urutan nukleotida -24 promoter *inhA* *M. tuberculosis*. Mutasi pada posisi tersebut merupakan salah satu penyebab terjadinya resistensi isoniazid. Prosedur penelitian ini meliputi isolasi DNA *M. tuberculosis* H37Rv, amplifikasi daerah promoter *inhA* *M. tuberculosis* H37Rv dengan metode PCR, dan optimasi digesti enzim restriksi SacII. Optimasi digesti dilakukan terhadap formulasi dan waktu digesti. Optimasi formulasi dilakukan dengan menggunakan *GM-ONE Buffer* dan *GM-Buffer IV*, sedangkan optimasi waktu digesti dilakukan selama 1 jam, 2 jam, dan 3 jam. Hasil optimasi digesti dengan enzim restriksi SacII menunjukkan bahwa enzim restriksi SacII bekerja lebih optimal pada formulasi menggunakan *GM-Buffer IV* dibandingkan *GM-ONE Buffer* dengan waktu inkubasi selama 3 jam. Dengan kondisi digesti optimal, enzim SacII dapat dimanfaatkan untuk deteksi mutasi urutan nukleotida -24 promoter *inhA* *M. tuberculosis* pada kasus MDR-TB dengan metode PCR-RFLP.

*Kata kunci: Optimasi Digesti, PCR-RFLP, Enzim Restriksi, SacII, M. tuberculosis, promoter inhA*

## ABSTRACT

The aim of this study was to optimize the digestion process of SacII restriction enzyme in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv isolate. SacII enzyme that have CCGC<sup>^</sup>GG restriction site could be used to detect the mutation at -24 promoter region of *inhA* *M. tuberculosis*. The mutation in this position is one of the causes of isoniazid resistance. The methods of this study were conducted in several step, respectively: DNA isolation of *M. tuberculosis* H37Rv, amplification of *inhA* promoter region of *M. tuberculosis* H37Rv using PCR method, and digest optimization using SacII. In this study, optimization of SacII digestion was conducted for formulaion and incubation time. The formulation was optimized

by GM-ONE Buffer and GM-Buffer IV, meanwhile the incubation time was optimized in 1 hour, 2 hour, and 3 hour. The result of this study showed that SacII work optimally in GM-Buffer IV compared to GM-ONE Buffer and incubate for 3 hours. Under the optimal digest condition, SacII enzyme could be used to detect the mutation at -24 promoter region of *inhA* in the case of MDR-TB using PCR-RFLP method.

*Keywords: Digest optimization, PCR-RFLP, Restriction enzyme, SacII, M. tuberculosis, inhA Promoter*

## PENDAHULUAN

*Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) merupakan penyakit Tuberkulosis (TB) yang disebabkan oleh strain *Mycobacterium tuberculosis* yang resistensi terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini pertama, sekurang-kurangnya isoniazid dan rifampisin (WHO, 2015). Adanya fenomena MDR-TB, menyebabkan penanganan TB menjadi lebih sulit, sehingga dibutuhkan deteksi dini MDR-TB agar pasien mendapat penanganan terapi secara cepat dan tepat serta menghindari terjadinya penyebaran MDR-TB.

Isoniazid (INH) merupakan obat anti tuberkulosis lini pertama yang sering digunakan. Resistensi INH dapat disebabkan karena adanya mutasi pada daerah tertentu dari sekuens DNA *M. tuberculosis*, salah satunya pada daerah promoter *inhA* (Karakousis, 2009). Salah satu titik mutasi yang pernah dilaporkan pada promoter *inhA* adalah pada nukleotida -24 dengan presentase sebesar 2,2% (Rindi *et al.*, 2005). Mutasi pada promoter *inhA* tidak hanya mengakibatkan terjadinya resistensi pada INH, tetapi juga bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi silang pada etionamid (ETH), yang merupakan OAT lini kedua (Machado *et al.*, 2013). Dengan adanya fenomena resistensi silang pada OAT lini kedua, menyebabkan deteksi mutasi pada promoter *inhA* menjadi penting dilakukan untuk ketepatan penanganan pasien.

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya mutasi pada kasus MDR-TB. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah Metode *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Metode ini menggunakan enzim restriksi yang secara spesifik mengenal urutan nukleotida tertentu

(Torrioni *et al.*, 1992). Beberapa keuntungan dari metode PCR-RFLP, yaitu cepat, sederhana, dan mudah dalam menafsirkan hasil (Caws *et al.*, 2007).

Suatu enzim restriksi memerlukan kondisi optimal untuk mampu melakukan pemotongan secara sempurna dan mampu menghasilkan fragmen restriksi yang sesuai. Kondisi optimal tersebut meliputi pH *buffer*, temperatur digesti, waktu digesti, dan konsentrasi garam dari *buffer* yang digunakan (Gerstein, 2001). Pada penelitian ini enzim restriksi yang digunakan adalah enzim restriksi SacII yang mampu mengenal secara spesifik pada urutan nukleotida -24 dari promoter *inhA* dengan situs restriksi CCGC<sup>^</sup>GG (Singleton, 2000). Optimasi digesti enzim restriksi SacII dilakukan terhadap formulasi dan waktu digesti. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan optimasi digesti enzim restriksi SacII pada isolat *M. tuberculosis* H37Rv dengan metode PCR-RFLP.

## BAHAN DAN METODE

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, satu set pipet mikro 0,5-10  $\mu$ L (Bio-Rad), tip (10, 20, 100, 200), mesin PCR *thermalcycler* (Veriti), inkubator, *microwave*, *collection tube*, vorteks, *shaker rotator* (tipe H-SR-200), *spin cycler*, *freezer*, *waterbath*, seperangkat alat elektroforesis, *biological safety cabinet class II*, dan UV Transilluminator (*Gel Doc*).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah DNA *M. tuberculosis* H37Rv, sepasang primer oligonukleotida untuk amplifikasi promoter *inhA*, PCR *Mix* yang terdiri atas DNA polimerase stabil, dNTP, dan MgCl<sub>2</sub>, gel

agarosa 1,5%, gel agarosa 1,6% (Thermo Scientific), TBE (Invitrogen), GelRed (Bio-tium), serta enzim restriksi SacII (GeneMark).

## Metode

### Isolasi DNA *M. tuberculosis* H37Rv

Tahap isolasi dilakukan dengan menggunakan kit. Kit yang digunakan adalah *High Pure PCR Template Preparation Kit*. Sel dilisiskan dengan menggunakan *Lysozyme*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Campuran tersebut ditambahkan *binding buffer* dan Proteinase K, diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Presipitasi DNA dilakukan dengan penambahan isopropanol. Pelet yang diperoleh dicuci dengan *inhibitor removal buffer*, kemudian dicuci dengan *wash buffer* sebanyak dua kali, lalu disentrifugasi 8000 g. Pelet yang diperoleh diletakkan pada *collection tube* 1,5 mL, lalu disentrifugasi 13000 g. Proses pemurnian dilakukan dengan penambahan *elution buffer*. Disentrifugasi 13000 g selama 2 menit. Larutan yang diperoleh digunakan sebagai templat PCR.

### Amplifikasi daerah promotor *inhA* DNA *M. tuberculosis* H37Rv dengan PCR

Proses PCR dilakukan dengan alat *thermaclycler*. Sepasang primer yang digunakan untuk amplifikasi telah dioptimasi pada penelitian Septiari dkk., (2014), yaitu *forward primer* (*mabA-inhA-promoter-FS*) dengan urutan 5' ACATACCTGCTGCGCAAT 3' dan *reverse primer* (*mabA-inhA-promoter-R*) dengan 5' CTCCGGTAACCAAGGACTGAA 3'. Proses amplifikasi dilakukan pada kondisi predenaturasi 95°C selama 15 menit, diikuti 45 siklus amplifikasi, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 54°C selama 1 menit 20 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 10 detik dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Deteksi ampikon menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% dalam TBE 1x dan divisualisasi dengan alat UV transiluminator (*Gel Doc*).

### Optimasi Digesti Enzim Restriksi SacII

Optimasi dilakukan terhadap formulasi dan waktu inkubasi. Optimasi formulasi dengan

membandingkan penggunaan *GM-ONE Buffer* dan *GM-Buffer IV*. Optimasi waktu dilakukan dengan inkubasi selama 1, 2 dan 3 jam. Inaktivasi enzim dilakukan pada suhu 65°C selama 20 menit. Deteksi hasil digesti dilakukan dengan gel agarosa 1,6% dan divisualisasi dengan menggunakan alat UV transiluminator (*Gel Doc*).

## HASIL

### Hasil Amplifikasi daerah promotor *inhA* *M. tuberculosis* H37Rv

Amplifikasi daerah promotor *inhA* *M. tuberculosis* H37Rv dengan proses seperti yang telah dijelaskan pada metode menghasilkan satu pita. Pita yang tampak pada gel agarosa memiliki ukuran ±284 pb (gambar 1), sesuai dengan target primer yang telah didesain.

### Optimasi Digesti Enzim Restriksi SacII

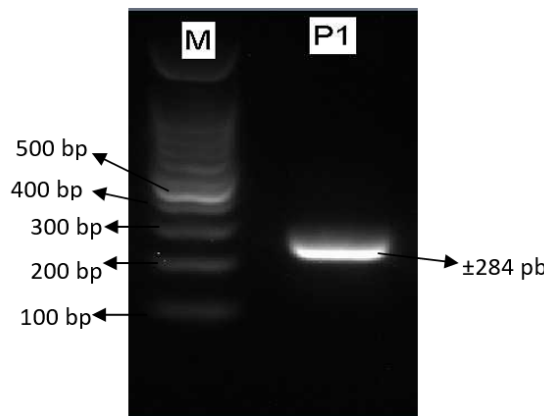
Proses optimasi digesti enzim restriksi SacII dilakukan terhadap formulasi dengan membandingkan penggunaan *GM-ONE Buffer* dan *GM-Buffer IV* dengan formula yang tertera pada tabel 1. Pada formula 1 dan formula 2 volume DNA-PCR dibuat sama untuk membandingkan hasil digesti yang optimal dengan penggunaan *GM-ONE Buffer* dan *GM-Buffer IV*, sedangkan formula 3 dibuat dengan volume DNA-PCR yang berbeda, untuk membandingkan hasil digesti yang lebih optimal dalam buffer yang sama, yaitu *GM-Buffer IV*. Hasil digesti terbaik yang dihasilkan adalah optimasi dengan Formula 3.

### Hasil Elektroforesis Optimasi Digesti Enzim Restriksi SacII

Hasil elektroforesis optimasi digesti enzim restriksi SacII (Gambar 2), menunjukkan bahwa pada formulasi dengan *GM-ONE Buffer* dan *GM-Buffer IV* dihasilkan 3 pita yang berukuran ±284 pb, ±195 pb, dan ±89 pb. Hal ini menunjukkan bahwa enzim restriksi belum mendigesti DNA substrat secara sempurna. Agar diperoleh hasil pemotongan enzim restriksi secara sempurna, dilakukan optimasi kembali dengan pengurangan jumlah DNA (Tabel 1, Formulasi 3).

Pada hasil optimasi kedua (Gambar 3) dihasilkan 2 pita berukuran ±195 pb dan ±89 pb. Hal ini menunjukkan bahwa dengan formulasi yang digunakan, enzim restriksi SacII yang memiliki situs restriksi CCGC^GG mampu memotong pada nukleotida -24 promoter *inhA*. Pemilihan enzim restriksi SacII untuk mendeteksi mutasi pada nukleotida -24 promoter *inhA* dilakukan secara *in silico* dengan

menggunakan aplikasi *Clone Manager Suite 6 (University of Groningen)*, di mana belum ada penelitian sebelumnya yang menggunakan enzim restriksi tersebut untuk mendeteksi mutasi pada nukleotida -24 promoter *inhA*. Pemilihan nukleotida -24 promoter *inhA*, berdasarkan adanya mutasi yang ditemukan oleh Rindi *et al.*, (2005).



Gambar 1. Elektroforegram hasil amplifikasi  
Keterangan: M: Marker DNA 100 pb; P1: *M. tuberculosis* H37Rv

Tabel 1. Formula Optimasi Digesti Enzim Restriksi SacII

Komposisi Bahan	Formula 1	Formula 2	Formula 3
DNA-PCR	7,5 µL	7,5 µL	5 µL
Enzim Restriksi SacII	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Buffer	2,5 µL <sup>1)</sup>	2,5 µL <sup>2)</sup>	2,5 µL <sup>2)</sup>
H <sub>2</sub> O	14,5 µL	14,5 µL	17 µL

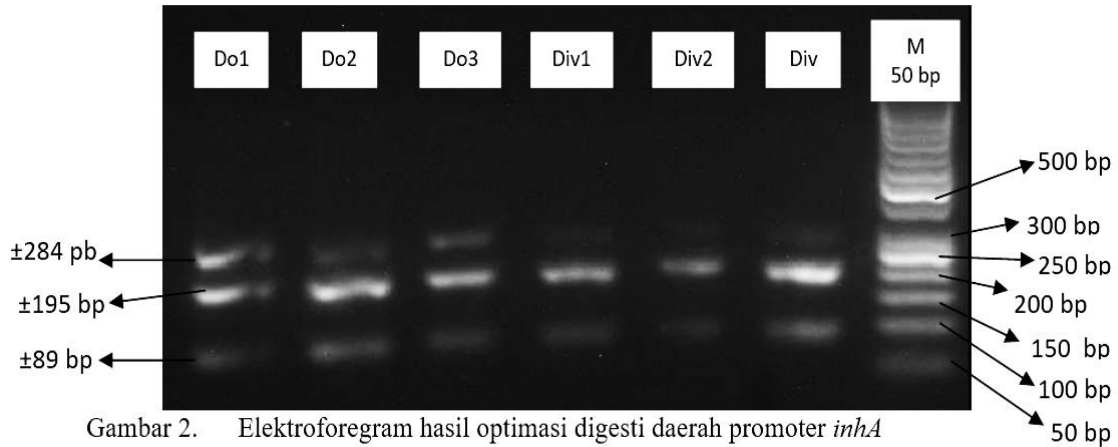
Keterangan: <sup>1)</sup> = *GM-ONE Buffer*, <sup>2)</sup> = *GM-Buffer IV*

## PEMBAHASAN

### Amplifikasi Daerah Promoter *inhA* *M. tuberculosis* H37Rv dan Deteksi Amplikon

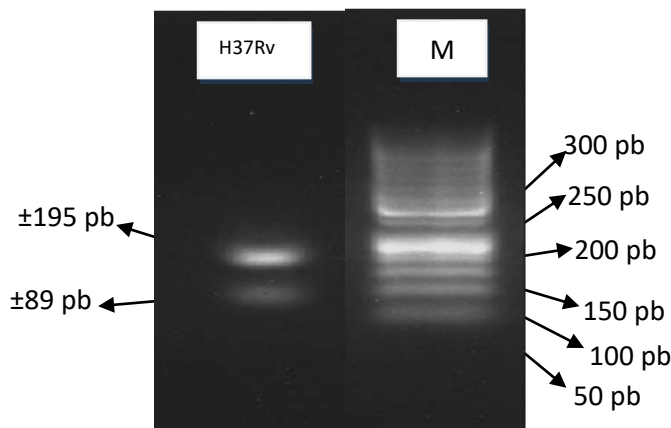
Tahap amplifikasi dilakukan menggunakan DNA templat hasil isolasi DNA *M. tuberculosis* H37Rv. Pita yang tampak seperti pada Gambar 1, menghasilkan satu pita tebal dengan ukuran sesuai dengan fragmen target yang diinginkan. Hal tersebut menunjukkan bahwa primer yang digunakan mampu mengamplifikasi fragmen target daerah promoter *inhA*.

Hasil amplifikasi pada penelitian ini juga telah mengonfirmasi bahwa primer dan kondisi PCR telah mampu mengamplifikasi daerah promoter *inhA* sesuai hasil optimasi yang dilakukan oleh Septiari, dkk (2014). Pita hasil elektroforegram yang cukup tebal tersebut menunjukkan bahwa jumlah DNA yang teramplifikasi cukup banyak. Dengan ketebalan tersebut, jumlah DNA hasil amplifikasi tersebut dianggap cukup untuk selanjutnya digunakan pada proses optimasi digesti dengan menggunakan enzim restriksi SacII.



Gambar 2. Elektroforegram hasil optimasi digesti daerah promoter *inhA*

Keterangan: Do1: Pita DNA formulasi dengan *GM-ONE Buffer* waktu inkubasi 1 jam; Do2: formulasi dengan *GM-ONE Buffer* waktu inkubasi 2 jam; Do3: formulasi dengan *GM-ONE Buffer* waktu inkubasi 3 jam; Div1: formulasi dengan *GM-Buffer IV* waktu inkubasi 1 jam; Div2: formulasi dengan *GM-Buffer IV* waktu inkubasi 2 jam; Div3: formulasi dengan *GM-Buffer IV* waktu inkubasi 3 jam; M: Marker DNA 50 pb



Gambar 3. Hasil Optimasi Digesti dengan formulasi DNA 5 µL  
Keterangan: M: Marker; H37Rv: DNA *M. tuberculosis* H37Rv

### Optimasi Digesti Enzim Restriksi *SacII*

Optimasi digesti enzim restriksi *SacII* dilakukan pada produk PCR isolat *M. tuberculosis* H37Rv. Penggunaan isolat *M. tuberculosis* H37Rv pada penelitian ini dikarenakan enzim restriksi yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim yang mengenal secara spesifik urutan nukleotida isolat *M. tuberculosis* pada nukleotida -24 promoter *inhA* dan memotong pada posisi tersebut menghasilkan 2 pita yang berukuran ±195 pb dan ±89 pb. Apabila terjadi perubahan urutan nukleotida karena adanya mutasi, enzim restriksi tidak dapat mengenal urutan nukleotida dan tidak akan memotong urutan nukleotida tersebut (Clark and Pazdernik, 2013). Untuk

mampu melakukan pemotongan secara sempurna dan menghasilkan fragmen restriksi yang sesuai, maka dilakukan optimasi digesti terhadap enzim restriksi *SacII*. Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah optimasi formulasi (*buffer*) dan waktu inkubasi.

Optimasi terhadap formulasi dilakukan menggunakan dua jenis *buffer* yang berbeda seperti yang tertera pada Tabel 1 (Formula 1 dan Formula 2). *Buffer* yang digunakan adalah *GM-ONE Buffer* dan *GM-Buffer IV* (GeneMark). Optimasi terhadap waktu inkubasi dilakukan selama 1 jam, 2 jam, dan 3 jam. Elektroforegram hasil optimasi digesti daerah promoter *inhA* dengan enzim restriksi *SacII* dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil elektroforesis, pada formulasi dengan *GM-ONE Buffer* maupun dengan *GM-Buffer IV* menunjukkan adanya pita yang berukuran  $\pm 284$  pb,  $\pm 195$  pb, dan  $\pm 89$  pb. Adanya pita yang berukuran  $\pm 195$  pb dan  $\pm 89$  pb menunjukkan bahwa enzim restriksi SacII mampu memotong produk PCR daerah promoter *inhA*. Namun adanya pita yang berukuran  $\pm 284$  pb menunjukkan bahwa masih terdapat DNA pada daerah promoter *inhA* yang belum terpotong oleh enzim restriksi SacII.

DNA yang tidak terdigesti secara sempurna dapat disebabkan karena *buffer* yang digunakan tidak sesuai dengan kondisi optimal suatu enzim mampu bekerja atau jumlah DNA dalam formulasi terdigesti terlalu banyak, sehingga kesetimbangan jumlah enzim dan substrat DNA belum tercapai dalam reaksi restriksi (Mulhardt, 2007).

Pita yang berukuran  $\pm 284$  pb pada formulasi dengan *GM-ONE Buffer* tampak jauh lebih tebal jika dibandingkan formulasi dengan *GM-Buffer IV*. Hal tersebut menunjukkan pada formulasi dengan *GM-Buffer IV* lebih banyak DNA yang mampu terpotong jika dibandingkan pada formulasi dengan *GM-ONE Buffer*, sehingga dapat dikatakan enzim restriksi SacII bekerja lebih optimal dengan *GM-Buffer IV*.

Berdasarkan definisi unit enzim restriksi SacII yang diperoleh dari GeneMark (GMbiolab Co), 1 unit enzim mampu menghidrolisis 1  $\mu$ g Lambda DNA (pada penelitian digunakan produk PCR) selama 1 jam pada suhu 37°C. Digesti enzim restriksi SacII dapat dilakukan pada waktu inkubasi maksimal selama 16 jam. Perpanjangan waktu digesti dapat meningkatkan performa dari suatu enzim restriksi dengan syarat stabilitas suatu enzim restriksi harus tetap terjaga (Gerstein, 2001).

Pemilihan waktu inkubasi hingga 3 jam dilakukan untuk memastikan bahwa enzim restriksi SacII mampu memotong secara sempurna pada daerah promoter *inhA* tanpa memerlukan waktu yang relatif lebih lama.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa pita yang paling baik dan tebal terlihat pada waktu inkubasi selama 3 jam pada formulasi dengan *GM-Buffer IV*. Namun pada hasil elektroforesis tersebut masih terdapat pita tipis yang berukuran  $\pm 284$  pb. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah enzim restriksi yang digunakan pada formulasi belum cukup untuk mendigesti DNA secara sempurna.

Oleh karena itu dilakukan optimasi kembali untuk memperoleh kondisi optimum enzim restriksi mampu mendigesti DNA secara sempurna. Optimasi formulasi dilakukan dengan menggunakan *GM-Buffer IV* dan waktu inkubasi selama 3 jam, namun jumlah DNA dikurangi (Tabel 1, Formulasi 3).

Hasil elektroforesis dapat dilihat pada gambar 3. Berdasarkan hasil elektroforesis optimasi digesti dengan formulasi pada tabel 1 (Formulasi 3), terbentuk 2 fragmen yang berukuran  $\pm 195$  pb dan  $\pm 89$  pb. Terbentuknya 2 fragmen menunjukkan bahwa dengan formulasi tersebut, enzim restriksi SacII mampu memotong nukleotida -24 daerah promoter *inhA*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa hasil optimasi dengan formulasi pada tabel 1 (Formulasi 3) dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi pada daerah promoter *inhA* posisi -24.

## KESIMPULAN

Hasil optimasi digesti enzim restriksi SacII menunjukkan bahwa enzim tersebut bekerja secara optimal dengan menggunakan *GM-Buffer IV* dibandingkan dengan *GM-ONE Buffer*. Hasil optimasi waktu digesti enzim restriksi SacII mendapatkan waktu inkubasi terbaik adalah selama 3 jam.

## UCAPAN TERIMA KASIH

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

## DAFTAR PUSTAKA

- Caws, M., Tho, D.Q., Lan, N.T.N., Hoa, D.V., M.E. Torok, T.T.H. Chau, N.V.V. Chau, N.T. Chinh, and J. Farrar. 2007. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid Low Cost Identification of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(6): 1789-1793.
- Clark, D. and N. Pazdernik. 2013. *Molecular Biology*. USA: Elsevier Inc.
- Gerstein, A.S. 2001. *Molecular Biology Problem Solver*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- GeneMark Bio. *Product Information Sac II*. Atlanta: GMLab Co. Available from: [http://www.genemarkbio.com/3.english/images/Datasheet/\(W\)Sac%20II-Sfr303%20I-E127-Lot-18-20140306.pdf](http://www.genemarkbio.com/3.english/images/Datasheet/(W)Sac%20II-Sfr303%20I-E127-Lot-18-20140306.pdf).
- Karakousis, P. C. 2009. Mechanisms of Action and Resistance of Antimycobacterial Agents. In: *Antimicrobial Drug Resistance*. D.L. Mayers, Springer: 271-291.
- Machado, D., Perdigao, J., Ramos, J., Couto, I., Portugal, I., Ritter, C., Boettger E.C. and Viveiros, M. 2013. High-level Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Multi drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa Family is Associated with *inhA* Double Mutations. *Journal of Clinical Microbiology*. 68(8): 1728-1732.
- Mulhardt, C. 2007. *Molecular Biology and Genomics*. USA: Elsevier.
- Rindi, L., L. Bianchi, E. Tortoli, N. Lari, D. Bonanni, and C. Garzelli. 2005. Mutations Responsible for *Mycobacterium tuberculosis* Isoniazid Resistance in Italy. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*, 9(1): 94-97.
- Septiari, I.G.A.A., P. S. Yustiantara., dan S.C. Yowani. 2015. Analisis Primer untuk Amplifikasi Promoter *inhA* Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Kimia*. 9(1): 117-123.
- Singleton, P. 2000. *DNA Methods in Clinical Microbiology*. Germany: Springer Science Business Media.
- Torrioni, A., Schurr, T.G., Yang, C.C., Szathmary, E.J., Williams, R.C., Schanfield, M.S., Knowler, W.C., Lawrence, D.N., and Weiss, K.M., 1992. Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That Amerind and The Nadene Population Were Founded by Two Independent Migrations. *Genetics*. 130: 153-162.
- World Health Organization. 2015. *Global Tuberculosis Report 2015*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.