

Detection of Mycobacterium Tuberculosis Resistance to Pyrazinamide Antibiotic Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique

Edy Kurniawan^{1*} & Idham Halid²

¹Politeknik Medica Farma Husada Mataram, Mataram, Indonesia;

²Politeknik Medica Farma Husada Mataram, Mataram, Indonesia;

Article History

Received : September 02th, 2022

Revised : October 20th, 2022

Accepted : November 15th, 2022

*Corresponding Author:

Edy Kurniawan,

Politeknik Medica Farma Husada
Mataram, Mataram, Indonesia;

Email:

kurniawanedyrafly86@gmail.com

Abstract: The tuberculosis treatment control program is constrained by the outbreak of TB that is resistant to anti-tuberculosis drugs (OAT), especially multidrug-resistant tuberculosis. Confirmation of tuberculosis drug resistance really needs to be done in each area considering that there are variations in phenotypes and genotypes in each region through laboratory tests such as molecular biology tests. Aim of study to determine the prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to pyrazinamide antibiotics by PCR technique. This research is a descriptive exploratory study which has been carried out in the molecular biology laboratory of West Nusa Tenggara Provincial Public Hospital. The sample in this study was positive TB sputum obtained from Patut Patuh Patju Hospital The Province of West Nusa Tenggara. The results showed that 5 of the samples were pyrazinamide resistant. Concluded that Resistance to pyrazinamide antibiotics was found from 10 samples, 5 of which had developed resistance to pyrazinamide antibiotics.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Pyrazinamide resistance; PCR

Pendahuluan

Indonesia termasuk dalam kelompok (high load countries), yaitu negara dengan kepadatan penduduk tertinggi menempati urutan ketiga setelah India dan China (Thakur, 2001). Prevalensi tuberkulosis paru (TB) di Indonesia periode 2009/2010 sebesar 0,73% per 100.000 penduduk yang tersebar di lima provinsi dengan kasus TB paru tertinggi yaitu Papua sebesar 1,4% per 100.000 penduduk, Banten 1,3%, per 100.000 penduduk, Sulawesi Utara dan Gorontalo sebesar 1,2%, dan Jakarta sebesar 1,03% per 100.000 penduduk (Kemenkes RI, 2010).

Kasus TB di Provinsi Nusa Tenggara Barat pada tahun 2016 mencapai 5.828 orang, dan sebanyak 3.860 diantaranya merupakan kasus baru (Bakteri Tahan Asam). Pada tahun 2017 jumlah penderita TB sebanyak 6.644 orang dengan 4.149 kasus baru TB BTA positif. Jika dibandingkan dengan tahun 2016, kasus TB pada tahun 2017 meningkat sebesar 14,04%. Data suspek TB tahun 2017 juga mengalami

peningkatan dibandingkan tahun 2016. Jika pada tahun 2016 ada 3.628 suspek TB yang diperiksa, pada tahun 2017 sebanyak 4.213 orang atau meningkat 25,29%. Yang perlu dicermati dari peningkatan suspek TB yang diperiksa pada tahun 2017 berdampak pada peningkatan pasien TB BTA positif dibandingkan tahun 2016, dari 3.860 orang menjadi 4.149 orang. Jika dilihat dari proporsi temuan BTA positif pada suspek, pada tahun 2017 mengalami penurunan menjadi 9,85% jika dibandingkan dengan tahun 2016 yang sebesar 11,48% (Wicaksana, 2016).

Program pengendalian pengobatan tuberkulosis yang dikenal dengan program DOTS (Directly Observed Treatment Shortcourse chemotherapy) dilaksanakan sebagai strategi pengendalian tuberkulosis yang diterapkan di semua negara, terutama negara-negara yang termasuk negara beban tinggi termasuk Indonesia (Jiwintarum et al., 2014). Di Indonesia khususnya dalam uji pendahuluan program manajemen pengobatan TB menggunakan obat anti tuberkulosis (OAT), KIE harus memperhatikan komunikasi informasi dan

edukasi yang komprehensif kepada pasien dan keluarganya mengenai berbagai hal yang berkaitan dengan pengobatan yang akan diberikan selama pengobatan. dan harus dilakukan dengan pengawasan langsung (Kemenkes RI, 2010).

Program kontrol pengobatan tuberculosis ini terkendala akibat merebaknya TB yang bersifat resisten terhadap obat anti tuberculosis (OAT), terutama *multidrug-resistance tuberculosis* yang didefinisikan sebagai resisten terhadap berbagai regimen obat antituberculosis yang salah satunya adalah pirazinamid. Konfirmasi resistensi obat tuberculosis sangat perlu dilakukan pada setiap daerah mengingat adanya variasi fenotipe dan genotype di setiap wilayah melalui uji laboratorium seperti uji biologi molekuler. Perkembangan teknik biologi molekuler khususnya metode PCR memungkinkan cara baru untuk mendeteksi adanya resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap OAT. Salah satu yang dapat dideteksi adalah analisis resistensi terhadap pirazinamid (PZA) (Jiwintarum et al., 2014).

Pirazinamid (PZA) merupakan analog nikotinamide yang pertama kali sebagai anti tuberculosis pada tahun 1952. Pirazinamid bertanggungjawab untuk membunuh kuman *Mycobakterium tuberculosis* yang semi dorman yang tidak mampu dibunuh oleh obat anti tuberculosis lainnya. Aktifitas pirazinamid spesifik untuk kuman *Mycobakterium tuberculosis* dan tidak memiliki efek terhadap mikobakterium lainnya. Pirazinamid hanya mampu bekerja pada suasana pH asam sehingga obat ini juga dapat membunuh kuman yang berada dalam jaringan nekrotik kaseosa (Gillespie, 2002). Target utama dari pirazinamid adalah enzim yang berperan dalam sintesis asam lemak. Pirazinamid merupakan *pro drug* yang harus dikonversi menjadi bentuk aktifnya yang disebut *pyrazinoic acid* oleh enzim pyrazinamidase. Enzim pyrazinamidase ini dihasilkan oleh phagolysome kuman dimana enzim pyrazinamidase ini dikode oleh *gen pncA*, dengan terjadinya perubahan pirazinamid menjadi bentuk aktifnya (pyrazinoic acid) maka akan terjadi penumpukan pyrazinoic acid di dalam sitoplasma dan didukung pula oleh tidak efektifnya *efflux system*. Akumulasi dari *pyrazinoic acid* menyebabkan penurunan pH

intrasel ke level yang menyebabkan terganggunya sintesis asam lemak (Santos, 2012).

Terjadinya mutasi pada *gen pncA* yang mengkode enzim *pyrazinamidase* akan menyebabkan enzim ini tidak dapat bekerja merubah pirazinamid yang masuk kedalam sel menjadi bentuk aktifnya yaitu *pyrazinoic acid*, dengan tidak terbentuknya *pyrazinoic acid* ini maka obat ini tidak dapat mengganggu sintesis asam lemak dan akan menyebabkan terjadinya resistensi pada kuman MTB terhadap pirazinamid (Pym et al., 2002). Penelitian ini perlu dilakukan karena analisis molekuler terhadap kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap antibiotic etambutol telah dilakukan oleh (Jiwintarum et al., 2014), telah terjadi resistensi dengan prevalensi sebesar 26% di wilayah NTB (Jiwintarum et al., 2014), sedangkan belum ada data kasus resistensi terhadap pirazinamid sebagai obat anti Tb lini pertama di NTB. Salah satu metode pemeriksaan untuk mendeteksi terjadinya resistensi OAT adalah dengan teknik PCR. PCR adalah metode yang cepat, spesifik, dan sensitive untuk mendeteksi adanya mutasi gen pada *Mycobacterium tuberculosis*. Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dengan teknik PCR dapat dilakukan dengan cepat dan tidak memerlukan sampel yang banyak. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang deteksi resistensi *Mycobakterium tuberculosis* terhadap antibiotic pirazinamid dengan teknik PCR.

Bahan dan Metode

Penelitian ini termasuk penelitian Deskriptif eksploratif yaitu bertujuan untuk mengetahui mutasi dari *gen pncA* pada penderita tuberculosis BTA positif dengan menggunakan teknik analisis molekuler PCR. Penelitian dilakukan di dua tempat yaitu RSUD Patut Patuh Patju Kabupaten Lombok Barat sebagai tempat pengambilan sampel BTA positif dan Laboratorium Mikrobiologi Instalasi Litbangkes RSUD Provinsi NTB yang terletak di kota Mataram sebagai tempat melakukan pemeriksaan uji molekuler PCR pada sampel BTA positif.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa sputum BTA positif. Sampel diambil dari RSUD Patut Patuh Patju Kabupaten

Lombok Barat. Selanjutnya sampel dikirim ke Laboratorium Mikrobiologi Instalasi Litbangkes RSUD Provinsi NTB. Pengambilan sampel penelitian dilakukan dengan menggunakan teknik kuota sampling dimana peneliti menetapkan 10 sampel yang dijadikan sampel penelitian. Maka pada saat akan dilakukan penelitian sampel yang akan dikumpulkan harus memenuhi kuota yang diinginkan yaitu 10 sampel. Kriteria yang harus dipenuhi yaitu sampel harus sputum BTA positif.

Sampel kemudian diperiksa dengan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan bantuan primer. Pasangan primer yang digunakan sebagai berikut seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Susunan Primer

| Nama | Susunan Basa | Referensi |
|--------------|------------------------------------|-------------------------------|
| <i>pncAF</i> | 5'- GGTCATGTTCGCGA TCGTCG-3' | (Campbell et al., 2011) |
| <i>pncAR</i> | 5'- ACAGTTCATCCCG GTTCGGC-3' | |

Cara Kerja

Ekstraksi DNA Template

Diambil sputum sebanyak 200 µl ke tabung ependorf kemudian ditambahkan juga Trizol 200 µl untuk membentuk suspensi sel ke dalamnya. Ke dalam tabung tersebut kemudian ditambahkan 200 µl kloroform, selanjutnya divortex hingga tercampur merata. Tujuan kloroform ini untuk melisiskan dinding sel bakteri. Setelah divortex selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit.

Selanjutnya diambil cairan bening yang berada paling atas kemudian pindahkan ke tabung yang baru setelah itu ditambahkan 100 µl etanol absolute dan disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Tujuan ditambahkan etanol absolute ini untuk mengendapkan DNA. Setelah DNA mengendap di dinding tabung dan cairan sisa etanol kemudian dibuang. Selanjutnya tahap washing (pencucian DNA) dengan menambahkan 100 µl etanol 80%. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit.

Selanjutnya dibuang sisa cairan dan ditambahkan kembali etanol tersebut lalu

disentrifuge kembali dengan kecepatan yang sama. Selanjutnya sisa cairan etanol dibuang setelah itu dikeringkan. Setelah kering, DNA akan berada di dasar dinding tabung. Langkah terakhir yaitu ditambahkan 50 µl aquadest ke dalam tabung berisi DNA tersebut kemudian homogenkan. Maka inilah DNA template yang kemudian akan dicampur dengan 2x master mix solution untuk proses PCR.

Proses Amplifikasi PCR

Ditambahkan 10µl 2x PCR master Mix solution (untuk total 20µl reaksi PCR) ke dalam tabung PCR, sedangkan 25µl 2x PCR master Mix solution (untuk total 50 µl reaksi PCR) ke dalam tabung PCR. Selanjutnya ditambahkan DNA template ke dalam tabung PCR tersebut sebanyak 1-2 µl (untuk total reaksi 20 µl). selanjutnya ditambahkan pasangan primer *pncA* Forward dan primer *pncA* Revers sebanyak 1 µl untuk masing-masing primer (untuk analisa diagnostik TB wild type, digunakan Primer TB1 dan TB2). Setelah itu ditambahkan distilat water sebanyak 6-7 µl sampai mencukupi 20 µl reaksi PCR. Selanjutnya hasil reaksi PCR dimasukkan ke dalam alat PCR untuk proses amplifikasi dengan parameter siklus amplifikasi sebagai berikut:

Pra Denaturasi : 93°C, 4 menit (1x)
Denaturasi : 93°C, 1 menit
Annealing : 55°C, 1 menit (35x)
Extension : 72°C, 1 menit
Final extension : 72°C, 4 menit (1x)

Elektroforesis

Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 2% dengan cara menimbang agarosa 0,8 gr bubuk agarose ke dalam 40 ml larutan bufer TBE. Larutan agarosa tersebut kemudian dididihkan di dalam mikrowave hingga larut sempurna. Selanjutnya disiapkan baki gel agarosa, dan dipasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki gel agarosa dengan posisi hampir menyentuh dasar baki. Larutan agaroses yang telah dididihkan, kemudian ditambahkan 1 µl etidium bromid (PERINGATAN KERAS!, gunakan sarung tangan karena bersifat karsinogenik). Kemudian larutan agarosa dihomogenkan sebentar, setelah itu dituangkan larutan ke dalam baki gel agarosa, biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat. Setelah

gel menjadi padat, ambil sisir elektroforesis dengan hati-hati.

Setelah itu baki gel diangkat kemudian dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan larutan bufer TBE 1x (pastikan gel terendam seluruhnya dalam TBE). Selanjutnya dimasukkan masing-masing 10 µl DNA standard dan sampel ke dalam sumuran gel agarosa dengan menggunakan mikropipet (perlu kehati-hatian hingga sampel tidak keluar dari sumuran gel agarosa).

Tahap selanjutnya proses elektroforesis dengan menghubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis, kemudian diatur voltase dan waktu running hingga diperoleh angka 100 V dan 45 menit. Kemudian dilakukan running dengan menekan tombol run. Elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis, yang ditandai oleh adanya bunyi alarm. Kemudian sumber arus dimatikan dan baki gel diangkat dari tangki elektroforesis, kemudian gel dikeluarkan dan diletakkan di atas UV transluminator, kemudian diamati pita-pita DNA yang tervisualisasi.

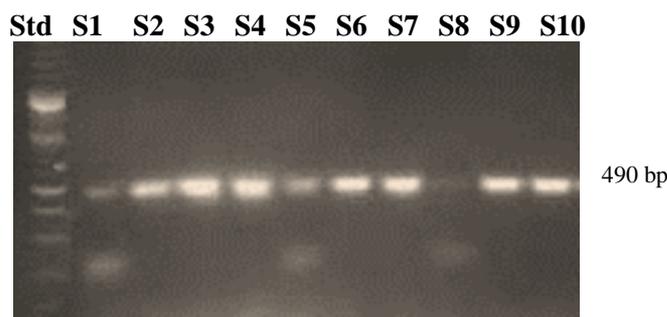
Pengumpulan data hasil PCR berupa pita-pita DNA didokumentasikan dan ditentukan ukuran pasang basa (bp) dari struktur DNA yang diketahui mengalami resistensi. Hasil tersebut kemudian dilaporkan dengan positif dan negatif dalam bentuk Tabel pengamatan untuk hasil dari pemeriksaan menggunakan primer TB ataupun hasil dari pemeriksaan primer pyrazinamid kemudian diberikan keterangan resisten dan sensitif.

Hasil Penelitian

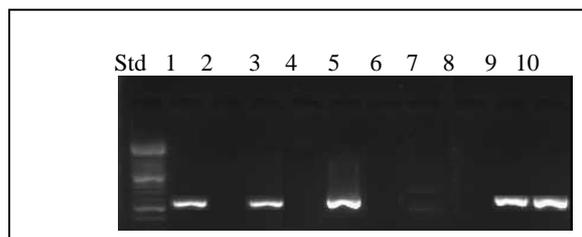
Pengujian dengan PCR dilakukan dua kali yaitu untuk mengetahui secara spesifik hasil diagnostik Tuberkulosis dengan menggunakan pasangan primer wild type yaitu primer TB1 dan primer TB2. Kemudian untuk mengetahui sensitivitas bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap antibiotik pyrazinamid digunakan pasangan primer *pncAF* dan *pncAR*. Hasil tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan TB dan Pyrazinamid dengan Teknik PCR

| Kode Sampel | Hasil | | Keterangan (resistensi/sensitif) |
|-------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------|
| | Primer TB (-/+) | Primer <i>pncA</i> (-/+) | |
| Tb 1 | + | + | Resisten |
| Tb 2 | + | - | Sensitive |
| Tb 3 | + | + | Resisten |
| Tb 4 | + | - | Sensitive |
| Tb 5 | + | + | Resisten |
| Tb 6 | + | - | Sensitive |
| Tb 7 | + | - | Resisten |
| Tb 8 | + | - | Sensitive |
| Tb 9 | + | + | Resisten |
| Tb 10 | + | + | Resisten |



Gambar 1. Amplifikasi gen DNA *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan primer TB1 dan TB2 dianalisa menggunakan gel agarose 2% dari 10 sampel sputum BTA positif



Gambar 2. Amplifikasi gen resisten pyrazinamid *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan primer *pncAF* dan *pncAR* dianalisa menggunakan gel agarose 2%, dari 10 sampel sputum BTA positif. Line Std: Standar DNA 1000bp. Line 1-10 spesimen no. 1 sampai 10.

Hasil penelitian tentang “Deteksi Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* Terhadap Antibiotik pirazinamid dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)” diperoleh hasil dari total 10 sampel yang dianalisa menggunakan teknologi molekuler PCR, didapatkan hasil bahwa 5 diantaranya diketahui telah resisten terhadap antibiotik pirazinamid, hal ini dapat terjadi karena beberapa hal yaitu penderita mengalami resistensi terhadap obat anti tuberkulosis yang terjadi secara primer dimana penderita belum pernah mendapat pengobatan tetapi telah mengalami resistensi obat akibat tertular oleh strain bakteri yang telah mengalami resistensi, selain itu, proses resistensi obat juga dapat dikarenakan penderita tidak patuh dalam konsumsi obat, serta rendahnya motivasi dari keluarga atau orang terdekat (Muhammad & Fadli, 2019).

Untuk mengetahui apakah hasil PCR menunjukan positif atau negatif, maka pada gel yang diletakkan di atas UV transluminator akan memvisualisasikan pita-pita DNA dari sumuran gel yang mengandung DNA positif, sedangkan pada sumuran gel yang mengandung DNA negatif maka pita-pita DNA tidak akan tervisualisasi. Pada sumuran gel yang tervisualisasi dapat dilihat bahwa semua sampel menunjukan pita-pita DNA pada sumuran gel yang berisi primer TB1 dan TB2. Sedangkan pada sumuran gel yang berisi primer *pncAF* dan *pncAR* menunjukan pita-pita DNA hanya pada sumuran gel nomor sampel S1, S3, S5, S9, dan S10.

Pirazinamid merupakan obat yang penting dalam mengurangi jangka waktu terapi tuberkulosis yang mestinya 9-12 bulan menjadi hanya 6 bulan saja. Hal ini disebabkan oleh kemampuan antituberculosis yang unik, yaitu kemampuan untuk membunuh kuman yang dalam kondisi semi-dorman pada kondisi PH asam. Aktivitas pirazinamid juga sangat spesifik menghambat *Mycobacterium tuberculosis* dan tidak berefek pada *Mycobakterium* yang lain (Irianti et al., 2012). Hasil penelitian, gen *pncA* tidak dapat mengkode enzim pirazinamid kedalam mekanisme aksi pirazinamid pada *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian ini sesuai dengan laporan penelitian sebelumnya bahwa isolat *M. tuberculosis* resisten pirazinamid antara 72-95% memiliki mutasi pada gen *pncA* (Santos, 2012). Meskipun demikian

terdapat laporan bahwa tidak semua *M. tuberculosis* yang resisten terhadap pirazinamid memiliki mutasi gen *pncA* (Palomino & Martin, 2014).

Gambaran hasil diagnostic dengan teknik PCR tersebut menunjukkan bahwa bakteri dapat menjadi resisten terhadap antibiotik yang sebelumnya efektif. Kemampuan bakteri tersebut untuk terus-menerus mengembangkan resistensi terhadap gen anti bakteri menyebabkan perlunya dikembangkan obat-obat baru. Timbulnya resisten sesuatu bakteri terhadap agen anti bakteri dalam suatu populasi besar sel bakteri yang terpapar anti bakteri cukup sederhana. Jika dalam suatu populasi besar sel, ada beberapa sel yang secara genotip resisten (mempunyai sifat resisten terhadap obat), sel yang dapat tumbuh dalam lingkungan antibiotik tersebut akan menghasilkan populasi baru yang sebagian besar merupakan genotip resisten. Timbulnya sedikit sel yang secara genotip resisten tersebut adalah akibat mutagenesis mikroba. Mekanisme biokimia resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu adalah dengan cara (1) penurunan permeabilitas terhadap antibiotik, (2) inaktivasi enzim antibiotik, (3) modifikasi sifat tempat reseptor obat, (4) peningkatan sintesis metabolit antagonis terhadap antibiotik (Jiwintarum et al., 2014).

Resistensi terhadap obat antituberculosis (OAT) ada 3 macam yaitu (1) mutan yang resisten, di dalam setiap populasi bakteri tuberkulosis (TB) akan ada bakteri dalam jumlah kecil yang resisten secara alami. Apabila hanya satu jenis obat yang diberikan, bakteri TB yang sensitive akan dibasmi, tetapi bakteri-bakteri yang resisten akan berkembangbiak. Karena itu jangan pernah memberikan pengobatan dengan obat tunggal (monoterapi); (2) resistensi sekunder/resistensi yang diperoleh, hal ini dapat timbul karena pengobatan tidak benar, pemberian 2 macam obat dimana salah satu obat sudah resisten, pasien gagal minum obat secara benar; (3) resistensi primer, terjadi apabila seseorang tertular oleh orang yang memiliki bakteri TB dengan resistensi yang diperoleh terhadap satu obat atau lebih (Irianti et al., 2012).

Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh (Kurniawan et al., 2015), yaitu tidak ditemukan kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap antibiotik etambutol dan isoniazid pada sampel dari sputum penderita

BTA (Bacill Tahan Asam) positif wilayah Lombok timur. Penelitian lain yang dilakukan oleh (Jiwintarum et al., 2014) melaporkan bahwa telah terjadi resistensi *M. tuberculosis* terhadap antibiotik rifampisin dengan prevalensi 26% di wilayah Nusa Tenggara Barat. Dengan demikian hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya oleh Jiawintarum et al, 2014, telah ditemukan kasus resistensi terhadap antibiotik pirazinamid di wilayah Lombok barat.

Pada penelitian analisis molekuler deteksi resistensi TB Paru BTA positif dengan antibiotik pirazinamid menunjukkan hasil 50% sampel resisten dapat disebabkan karena terjadinya modifikasi sifat pada tempat reseptor obat/modifikasi pada daerah sasaran obat (mutasi), dimana mutan resistensi-pirazinamid mempunyai enzim pirazinamidase yang dikode oleh gen *pncA*, pyrazinoic acid ini akan mengganggu sistem transport membran sel bakteri. Sangat perlu dilakukan pelaporan bentuk apapun yang diperoleh dalam pengamatan mikroskopis BTA pada 5 bulan setelah terapi. Untuk pemetaan munculnya MDR pada orang dengan resistensi primer di daerah NTB, maka perlu dilakukan penelitian tentang sifat resistensi *Mycobacterium tuberculosis* dengan antibiotik berbeda di Kabupaten lain di NTB.

Kesimpulan

Ditemukan resistensi terhadap antibiotik pirazinamid dari 10 sampel, 5 diantaranya telah mengalami resisten antibiotik pyrazinamid. Hal tersebut membuktikan bahwa terdapat *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap antibiotik pyrazinamid di wilayah Lombok Barat, dan tidak menutup kemungkinan kejadian resistensi ini telah banyak tersebar di seluruh wilayah Nusa Tenggara Barat dan Indonesia pada umumnya.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada semua pihak yang telah berperan dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan artikel ilmiah ini, baik berupa moril maupun materi.

Referensi

Campbell, P. J., Morlock, G. P., Sikes, R. D., Dalton, T. L., Metchock, B., Starks, A. M.,

- Hooks, D. P., Cowan, L. S., Plikaytis, B. B., ... & Posey, J. E. (2011). Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2032–2041. <https://doi.org/10.1128/AAC.01550-10>
- Gillespie, S. H. (2002). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 267–274. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.267-274.2002>
- Irianti, Kuswandi, Yasin, N. F., & Kusumaningtyas, R. A. (2012). Mengenal Anti-Tuberculosis. In *Current Bioactive Compounds* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.2174/1573407210602010105>
- Jiwintarum, Y., Diarti, M. W., & Dramawan, A. (2014). RESISTENSI PRIMER MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DENGAN TARGET Gen *rpoB*. *Jurnal Kesehatan Prima*, 8(1), 1224–1231.
- Kemendes RI. (2010). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Profil Kesehatan Indonesia. In *Profil Kesehatan Indonesia 2010*.
- Kurniawan, E., Diarti, W., Pristianingrum, S. (2015). Analisis Molekuler Mdr Tb Dengan Teknik Sekuensing Dari Sampel Dahak Suspek Tb Di Nusa Tenggara Barat. *Jurnal Kesehatan Prima*, 9(1), 1436–1443.
- Muhammad, M., & Fadli, F. (2019). Analisis Faktor Penyebab Multi-Drug Resistance (Mdr) Pada Penderita Tuberkulosis. *Jurnal Publikasi Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 6(2), 62–67. <https://doi.org/10.20527/jpkmi.v6i2.7454>
- Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, 3(3), 317–340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030317>
- Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., & Steward, T. C. (2002). Loss of RD1 Contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccine *Mycobacterium*

- bovis BCG and Mycobacterium microti. *Molecular Microbiology*, 46(3), 709–717.
- Santos, L. C. (2012). Review: The Molecular Basis of Resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>. *Open Journal of Medical Microbiology*, 02(01), 24–36. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2012.21004>
- Thakur, M. (2001). Global tuberculosis control report. *The National Medical Journal of India*, 14(3), 189–190.
- Wicaksana, A. (2016). <https://Medium.Com/>. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pe-ngertian-use-case-a7e576e1b6bf>