

Analisis RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) untuk Diferensiasi *Mycobacterium tuberculosis* isolat klinik sensitif INH dan Rifampisin di Makassar

Zuhriana K. Yusuf

Staf Dosen Jurusan Keperawatan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Keolahragaan
Universitas Negeri Gorontalo

ABSTRAK. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat keragaman genetik pada *M.tuberculosis* isolat klinik yang sensitif INH dan rifampisin dengan metode RAPD serta bagaimana gambaran diferensiasi polimorfismenya. Sampel pada penelitian ini adalah isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin sebanyak 5 isolat. Penelitian ini meliputi ekstraksi DNA dengan metode *Wizard Genom DNA purification*, amplifikasi menggunakan 5 primer yaitu A-2 (5' TGCCGAGTCG 3' , 70% G+C), OPN-09 (5'TGCCGGCTTG 3' , 70% G+C), N-9 (5' TGCCGGCTTG 3' , 70% G+C), BG-66 (5'CGACGCTGCG 3' , 80% G+C) , 80% G+C), U-19 (5' GTCAGTGCGG 3' , 70% G+C) dan elektroforesis. Diversitas genetik isolat dianalisa dengan metode *Dendro Unweighted Pair Group Method of Arithmetic* (UPGMA) : *A Dendrogram Construction Utility method* from Dr. Santi Garcia-Valive/2009. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat keragaman genetik pada 5 isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin yang diamplifikasi dengan menggunakan 5 primer. Pita DNA yang berhasil diamplifikasi ukurannya berkisar antara 200-1100bp. Variasi genetik dilihat dari perbedaan jumlah fragmen, ukuran fragmen dan jumlah pita polimorfik. Persentase polimorfik dari isolat-isolat tersebut antara 66,67%-100% atau rata-rata 80,28%, dan hasil analisis UPGMA menghasilkan dendrogram dengan koefisien kekerabatan 0 – 40% atau terdapat keragaman 60 – 100%.

Kata kunci : RAPD, *Mycobacterium tuberculosis*, sensitif INH dan rifampisin

ABSTRACT. This study aims to find out: (1) whether there is a genetic diversity on *M.tuberculosis* isolat clinic that is sensitif to INH dan rifampisin with RAPD method, and (2) the description of its polimorfism differentiation. The research samples include 5 *Mycobacterium tuberculosis* isolate that is sensitive to INH and rifampisin. The study includes DNA extraction using *Wizard Genom DNA purification method*, amplification using 5 primer: A-2 (5' TGCCGAGTCG 3' , 70% G+C), OPN-09 (5'TGCCGGCTTG 3' , 70% G+C), N-9 (5' TGCCGGCTTG 3' , 70% G+C), BG-66 (5'CGACGCTGCG 3' , 80% G+C) , 80% G+C), U-19 (5' GTCAGTGCGG 3' , 70% G+C), and elektroforesis. The isolat genetic diversity was analysed by using *Dendro Unweighted Pair Group Method of Arithmetic* (UPGMA) : *A Dendrogram Construction Utility method* from Dr. Santi Garcia-Valive/2009. The results show that there is a genetic diversity on the 5 isolate *Mycobacterium tuberculosis* that are sensitive to INH and rifampisin, amplified with 5 primer. The size of amplified DNA bands is between 200-1100bp. The genetic variation can be seen in the number of fragments, the size of fragments and the number of polimorfik bands. The polimorfik percentage of the isolate is between 66.67% - 100%, or 80.28 in average. The UPGMA analysis results in a dendrogram with a group coefficient of 0 – 40% or a diversity of 60 – 100%.

Keywords: RAPD, *Mycobacterium tuberculosis*, sensitive to INH and rifampisin.

PENDAHULUAN

Infeksi *Mycobacterium* termasuk yang sulit disembuhkan dari semua jenis infeksi bakteri, mikroorganisme ini lambat perkembangannya dan dinding selnya kaya akan lipid,

sehingga tahan asam dengan pewarnaan. Salah satu diantara mikroorganisme tersebut adalah *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan penyebab penyakit tuberkulosis, yang sampai saat ini masih menjadi masalah serius di beberapa negara, karena angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Depkes RI,2002). Pada tahun 1993 WHO telah mencanangkan tuberkulosis sebagai Global Emergency, karena sebagian besar negara di dunia sudah terjangkiti penyakit ini, dan banyak penderita yang tidak dapat disembuhkan. Laporan WHO tahun 2007 menyatakan bahwa 8,8 juta kasus baru tuberkulosis pada tahun 2005. 7,4 juta diantaranya terdapat di Asia dan Afrika (WHO,2007) . Indonesia menempati urutan ke 3 didunia untuk jumlah kasus tuberkulosis setelah India dan Cina. Setiap tahun terdapat 583.000 kasus baru tuberkulosis dan sekitar 140.000 kematian akibat penyakit ini. Tuberkulosis adalah pembunuh nomor satu diantara penyakit menular dan merupakan penyebab kematian nomor 3 setelah penyakit jantung dan penyakit pernapasan akut pada seluruh kalangan usia (Depkes RI,2002: WHO,2007). Makassar yang berpenduduk 1,3 juta jiwa merupakan daerah yang memiliki jumlah penderita tuberkulosis terbanyak di Sulawesi Selatan, yakni 1.532 orang dari sekitar 18.000 penderita, yang tersebar di 23 kabupaten/kota di Sulawesi Selatan. Selain prevalensi tuberkulosis cukup tinggi, angka kesembuhan (*cure rate*) penderita tuberkulosis di Makassar juga baru mencapai 90 persen pada periode 2007, sementara target nasional adalah 95 persen, namun lebih baik dibanding *cure rate* 2006 yang hanya 59 persen dengan 1.678 penderita. Penderita tuberkulosis di ibukota Sulawesi Selatan ini mengalami peningkatan dalam empat tahun terakhir, karena pada tahun 2003 baru tercatat 809 orang, pada tahun 2004 naik menjadi sebanyak 1.304 penderita dan 2005 naik lagi menjadi 1.532 penderita (Anonim, 2008).Seiring dengan meningkatnya kasus tuberkulosis maka angka resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) juga meningkat, baik resistensi primer maupun sekunder. *Multi drug-resistant* tuberkulosis (MDR-TB) merupakan masalah terbesar pemberantasan tuberkulosis di dunia. Lebih dari 50 juta orang diperkirakan telah terinfeksi oleh *M.tuberculosis* yang resisten terhadap OAT, khususnya rifampisin dan isoniazid (INH) (Viska. O , 2007). Selain pengobatan, pentingnya uji epidemiologi untuk mengetahui sumber infeksi menjadi salah satu hal yang penting dalam pengendalian tuberkulosis. Oleh karena itu perlu adanya suatu metode yang efektif untuk diferensiasi (pembedaan) galur *M.tuberculosis*. Ada beberapa metode yang sering digunakan dalam epidemiologi seperti kepekaan antibiotik, biologi molekuler, khususnya pada pengkajian karakter bahan genetik *biotyping* dan *typing* bakteriofaga, tetapi pola yang diperoleh kurang dapat memberikan gambaran mengenai diferensiasi galur (Singh *et al.*, 2006).Metode RAPD menggunakan primer oligonukleotida pendek dengan low-stringency PCR untuk mengamplifikasi fragmen DNA tertentu yang dapat digunakan sebagai marka molekuler. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan heterogenitas genetik berdasarkan diversitas urutan DNA. Hasil yang diperoleh dapat merupakan sidik jari (fingerprinting) dan telah berhasil dilakukan pada *M.tuberculosis* dan patogen lainnya (Singh *et al.*, 2006) . Salah satu cara yang dapat digunakan sebagai alternatif untuk diagnosis tuberkulosis diantaranya adalah dengan mencari fragmen DNA yang spesifik dari *M.tuberculosis* untuk memperoleh penanda, dengan metode yang lebih mudah, murah dan cepat dibanding metode lainnya yaitu RAPD. Sebagai langkah awal untuk memperoleh penanda maka di Makassar akan dilakukan penelitian dengan metode RAPD untuk membuktikan gambaran heterogenitas *M.tuberculosis* isolat klinik yang sensitif terhadap INH dan rifampisin.

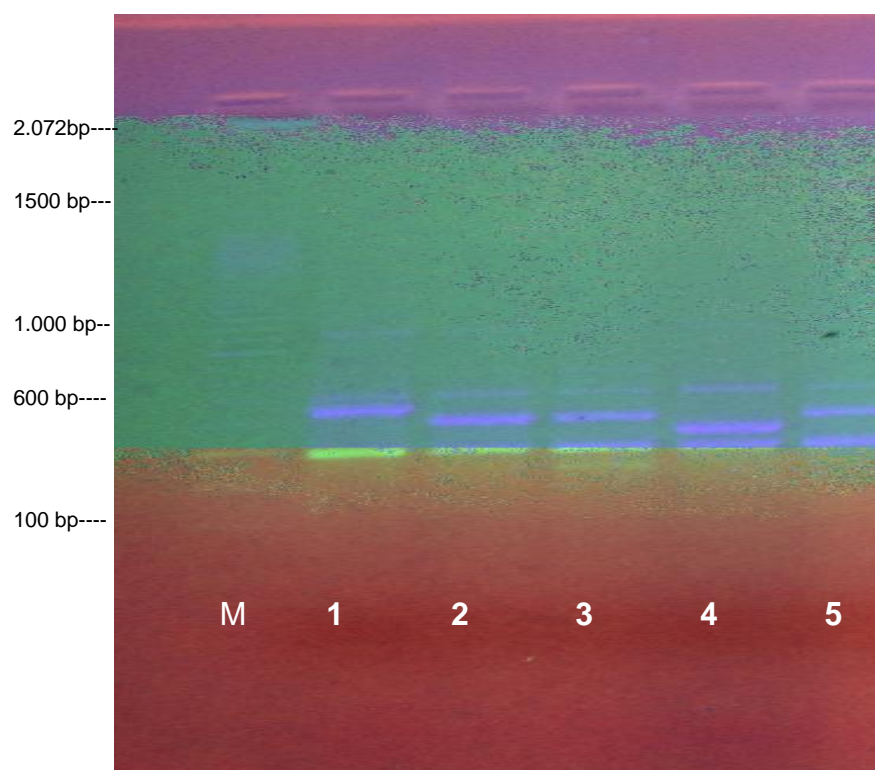
BAHAN DAN METODE

Sampel adalah 5 isolat *M.tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin, yang di amplifikasi dengan PCR-RAPD yang menggunakan 5 primer oligonukleotida pendek yaitu A-2 (5' TGCCGAGTCG 3' , 70% G+C), OPN-09 (5'TGCCGGCTTG 3' , 70% G + C), N-9(5' TGCCGGCTTG 3' , 70% G + C), BG-66 (5' CTCGAGCCGGC 3; 80% G+C), U - 19 (5'

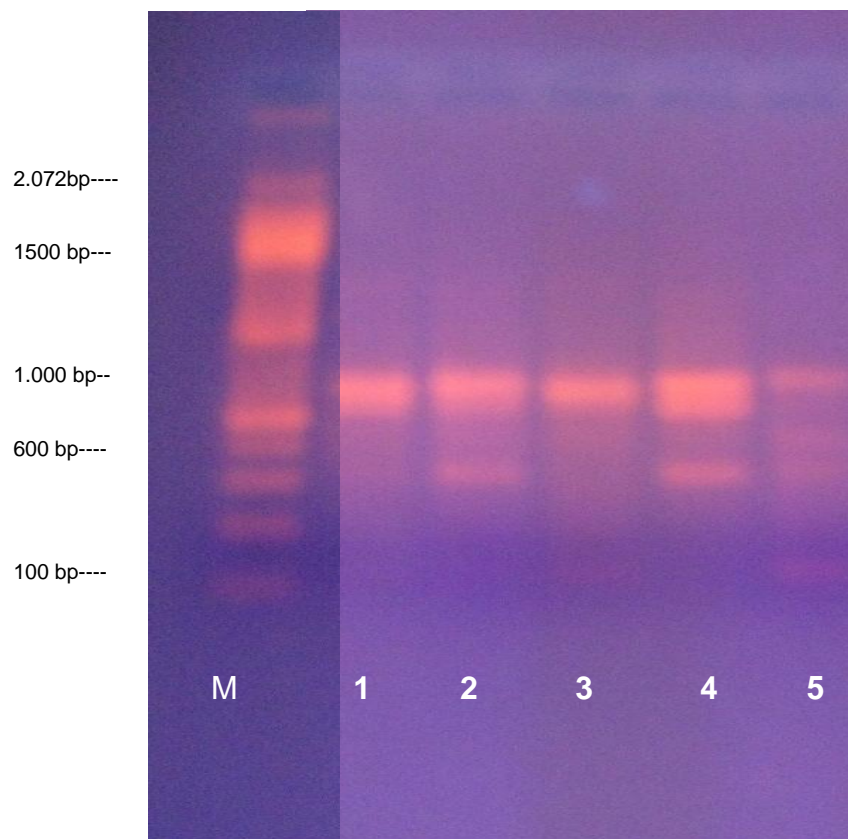
GTCAGTGCGG 3', 70% G+C). Ekstraksi DNA dengan metode *Wizard-Genome DNA Purification* KIT (Promega®), yaitu dengan sebagai berikut : Sampel dimasukkan kedalam tube mikrosentrifus 1,5 ml yang telah diisi dengan aquades steril , kemudian disimpan dalam suhu ruangan selama 24 jam. Sampel disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 13.000rpm, kemudian supernatan dibuang. Tambahkan 480µl dari 50mM EDTA. Tambahkan 120µl enzim lysis, kemudian kocok. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam, sentrifus 13.000rpm selama 2 menit, buang supernatan. Tambahkan 600µl larutan nuclei lysis, kemudian kocok. Inkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit untuk melisis sel. Dinginkan sampai suhu kamar. Tambahkan 3 µl larutan RNase, bolak – balik 2 – 5 kali untuk mencampur. Inkubasi 37°C selama 30 menit. Setelah itu tunggu sampai sama dengan suhu ruangan. Tambahkan 200µl larutan protein precipitation, Vortex pada kecepatan tinggi 20 detik untuk mencampur. Inkubasi diatas es selama 5 menit. Sentrifus dengan kecepatan 13.000rpm selama 3 menit. Pindahkan supernatan yang mengandung DNA ke tabung mikrosentrifus 1,5ml. Tambahkan 600µl isopropanol, campur dengan membolak-balik tabung. Sentrifus dengan kecepatan 13.000rpm selama 2 menit. Buang supernatan dan keringkan tabung dengan tisu. Tambahkan 600µl etanol 70% dan kocok tabung beberapa kali untuk mencuci DNA. Sentrifus dengan kecepatan 13.000rpm selama 2 menit, supernatan dibuang. Dikeringkan dengan *Clean Absorbent Paper* selama 10-15 menit. Tambahkan 100 µl DNA Rehydration Solution. Diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam, atau disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam. Simpan pada suhu 2°C - 8°C, untuk menunggu pengerjaan lebih lanjut atau apabila pekerjaan ditunda. Analisis RAPD dengan menggunakan 5 primer oligonukleotida pendek. Bahan PCR : 10X buffer 2,5µl, MgCl 2 3µl, dNTP 0,5µl, Primer 1µl, Tag 0,125µl, ddH2O 12,875µl, DNA 5µl. Kondisi PCR: pre PCR 94° C 5 menit, denaturasi 94°C 1 menit, annealing 36° C 1 menit, ekstensi 72° C 1 menit, post PCR 72° C 5 menit dan 4°C tak terhingga, dengan 45 kali siklus. Kemudian dielektroforesis dengan gel agarose dengan pewarnaan ethium bromida. Pola pita yang diperoleh dari RAPD ditentukan dari hasil foto. Diversitas genetik isolat dianalisa dengan metode *Dendro Unweighted Pair Group Method of Arithmetic* (UPGMA) : *A Dendogram Construction Utility method* from Dr. Santi Garcia-Valive/2009.

HASIL

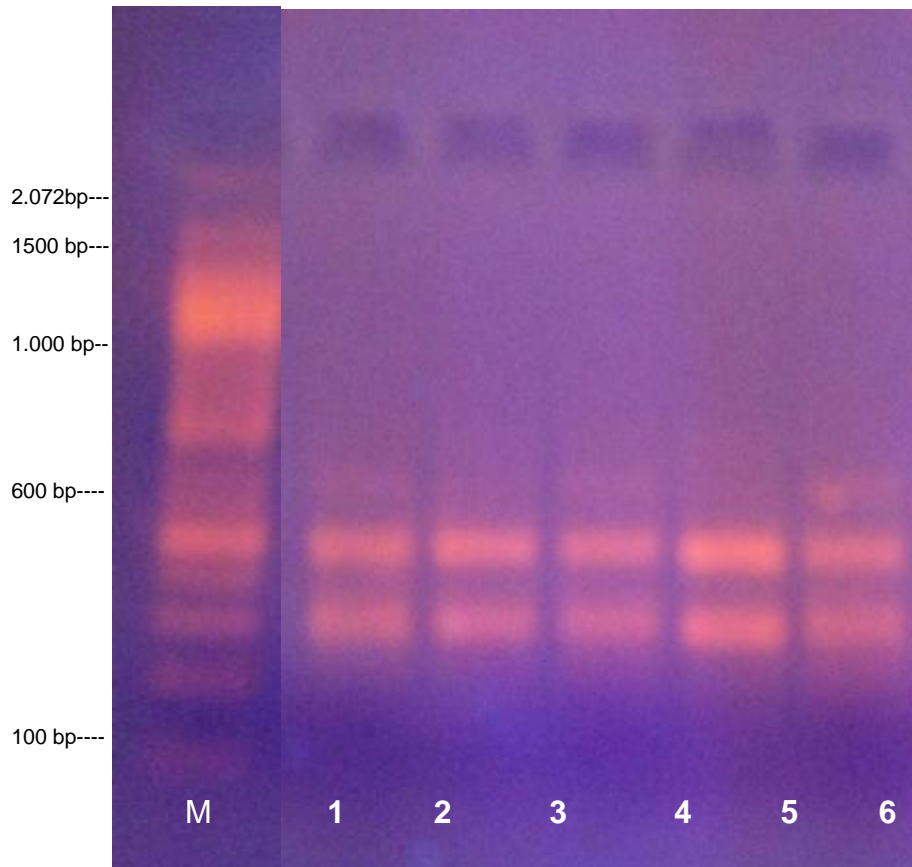
Hasil dari penelitian ini berupa analisis PCR – RAPD terhadap isolat *M.tuberculosis* sensitif INH dan Rifampisin dengan menggunakan 5 primer, disajikan dalam bentuk gambar 1.



Gambar 1. Pola fragmen DNA hasil amplifikasi PCR-RAPD terhadap isolat klinik *M. tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin (sampel 1-5), menggunakan *primer A 2* dengan ukuran 200-1000bp. M = Marker.



Gambar 2. Pola fragmen DNA hasil amplifikasi PCR-RAPD terhadap isolat klinik *M. tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin (sampel 1-5), menggunakan *primer OPN-9* dengan ukuran 200-1100bp. M = Marker

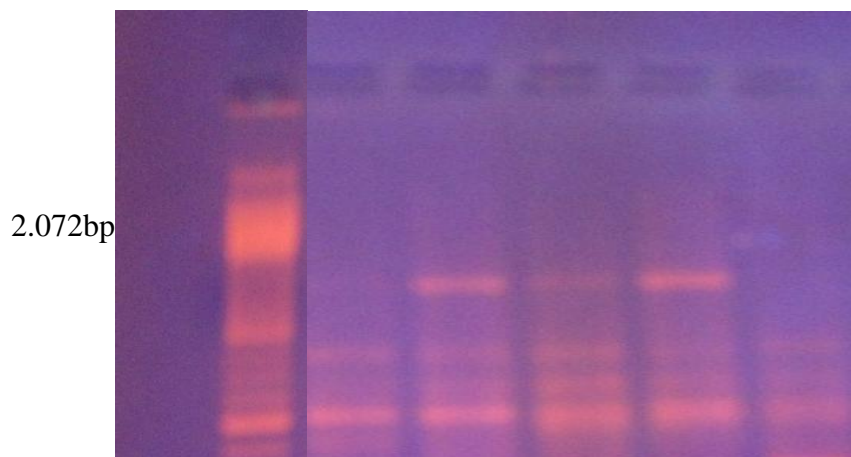


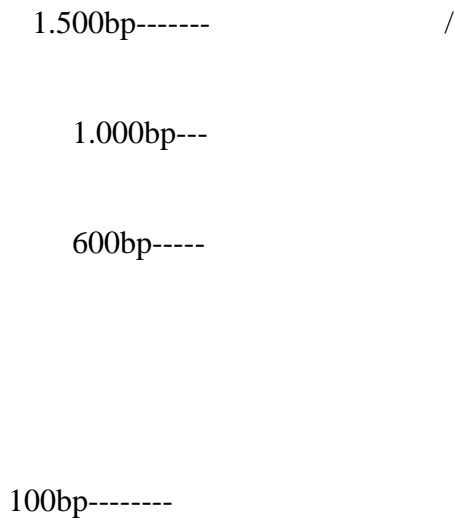
Gambar 3 Pola fragmen DNA hasil amplifikasi PCR-RAPD terhadap isolat klinik *M.tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin (sampel 1-5), menggunakan *primer U-19* dengan ukuran 300-800bp. M = Marker



2.072 bp-----
1500 bp----
1.000bp-----
600 bp-----
100 bp-----

Gambar 4. Pola fragmen DNA hasil amplifikasi PCR-RAPD isolat klinik *M. Tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin (sampel 1-5), menggunakan primer N-9 dengan ukuran 300-1000. M = Marker





Gambar 5. Pola fragmen DNA hasil amplifikasi PCR-RAPD isolat klinik *M. tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin (sampel 1-5), menggunakan primer BG-66 dengan ukuran 300-1100. M = Marker

Berdasarkan gambar 1 – 5, dilakukan penilaian terhadap kemunculan fragmen pita DNA, dengan ketentuan skor 1 bila ada pita dan skor 0 bila tidak ada pita. Hasil penilaian dipindahkan ke data biner yang disajikan pada lampiran 1 – 5. Berdasarkan data biner pada lampiran tersebut, maka dapat diketahui profil DNA seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Variasi genetik isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin.

Fragmen DNA	Primer yang digunakan				
	A - 2	OPN-09	U - 19	N - 9	BG-66
Jumlah	8	6	6	7	7
Ukuran	300-1000	200-1100	300 - 800	300-1000	300-1100

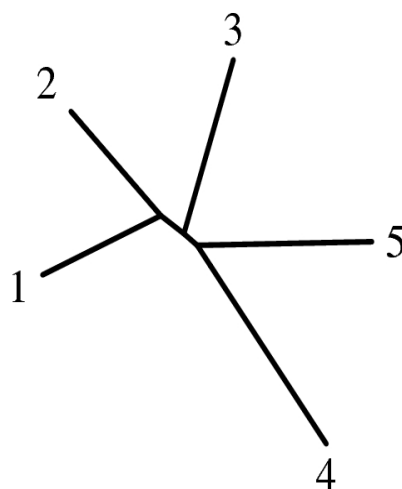
Polimorfik	6	5	4	7	5
% polimorfik	75	83,33	66,67	100	71,43

Hasil analisa kekerabatan atau jarak genetik antar isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Jarak genetik isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin berdasarkan penanda RAPD

Isolat MTB sensitif INH dan rifampisin	1	2	3	4	5
1	-	0,469	0,600	0,707	0,583
2	-	-	0,548	0,721	0,566
3	-	-	-	0,735	0,687
4	-	-	-	-	0,693
5	-	-	-	-	-

Hasil analisis pengelompokan antar individu isolat *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode *Unweighted Pair Group Method of Arithmetic* (UPGMA) dari Nei's (1972/1978) menggunakan program TFPGA (Miller 2000) terlihat seperti dendogram pada gambar 6.



Gambar 6. Dendogram isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin hasil amplifikasi menggunakan 5 primer.

PEMBAHASAN

Studi epidemiologi dari *Mycobacterium tuberculosis* seringkali terhambat dengan sulitnya mengidentifikasi karakteristik strain – strain penyebab penyakit tuberkulosis tersebut. Kemampuan untuk membedakan strain dari *Mycobacterium tuberculosis* dapat digunakan untuk meneliti sumber penyakit, ciri-ciri dari beberapa strain pada pasien –pasien yang berasal dari daerah yang berdekatan. Yang pada akhirnya akan membantu dalam proses pengobatan dan penyembuhan penyakit (Singh, 2006). Pada penelitian ini, ditemukan adanya keragaman genetik pada 5 isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin yang berasal dari kota Makassar. Keragaman genetik ini dapat mempengaruhi interaksi antara host dan bakteri, immunogenisitas, transmisi, dan resistensi obat terhadap penyakit (Homolka S, 2008). Berdasarkan gambar 1-5, terlihat bahwa 5 primer mampu menghasilkan pita amplifikasi genom DNA *Mycobacterium tuberculosis* isolat klinik sensitif INH dan rifampisin, yang setelah dilakukan penilaian didapatkan terdapat variasi genetik pada profil DNA masing –masing isolat. Variasi tersebut dapat dilihat dari perbedaan jumlah fragmen, ukuran fragmen, jumlah pita polimorfik, dan persentase polimorfik seperti yang tampak pada Tabel 1. Sangat diharapkan informasi keragaman genetik dari organisme ini dapat menurunkan mortalitas dan morbiditas penyakit (Richner S. M, 1998).Persentase polimorfik tertinggi ditemukan pada amplifikasi dengan primer N 9 yaitu 100 %, disusul dengan primer OPN 9 83,33 %, primer A 2 75 %, primer BG 66 71,43% dan primer U 19 66,67%. Rata – rata persentase polimorfik adalah 80,28%. Tingkat polimorfisme yang ditemukan dalam penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Lestari di Jember, yaitu 67 %. Polimorfisme merupakan perbedaan yang dapat diwariskan yang ditemukan diantara individu dalam satu populasi. Tingkat keragaman individu dalam populasi menggambarkan status keberadaan spesies tersebut di alam. Populasi yang memiliki polimorfisme yang tinggi memiliki peluang hidup yang lebih baik. Hal ini disebabkan setiap gen memiliki respon yang berbeda – beda terhadap kondisi lingkungan, sehingga dengan dimilikinya berbagai macam gen dari individu-individu dalam populasi maka berbagai perubahan lingkungan yang ada akan dapat direspon lebih baik. Sedangkan tingkat keragaman yang rendah akan menyebabkan terjadinya *inbreeding* karena penurunan ukuran populasi efektif di alam (Yusron, 2005).Hasil analisa kekerabatan atau jarak genetik antar isolat seperti yang diperlihatkan pada Tabel 2, menunjukkan jarak genetik tertinggi terdapat antara isolat nomor 3 dan 4 yaitu 0,735 dan yang paling rendah terdapat antara isolat nomor 1 dan 2 , yaitu 0,469. Semakin kecil jarak genetik berarti semakin dekat hubungan kekerabatan antara isolat - isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin tersebut. Hasil analisis UPGMA terhadap isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin menghasilkan dendogram dengan koefisien kekerabatan 0 – 30% atau terdapat keragaman 70 – 100% . Pada koefisien kekerabatan 30% atau keragaman subpopulasi 70% terbentuk 2 subpopulasi yaitu subpopulasi 1 yang beranggotakan 2 isolat yaitu isolat nomor 1 dan 2, sedangkan subpopulasi 2 beranggotakan 1 isolat, yaitu isolat nomor 3 dan subpopulasi 3 beranggotakan 2 isolat yaitu 4 dan 5. Berdasarkan hubungan kekerabatan diatas, dapat dilihat bahwa terdapat keanekaragaman yang jelas pada isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin di Makassar yang dianalisis dengan metode RAPD. Keberhasilan metode ini sangat ditentukan oleh kemurnian primer, kualitas DNA, kondisi PCR dan protokol standar elektroforesis (Singh 2002).Namun pada penelitian ini belum ditemukan fragmen DNA spesifik yang nantinya dapat dikembangkan untuk menjadi penanda molekuler untuk *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin, yang diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan dalam memberantas penyakit tuberkulosis.

SIMPULAN

Terdapat keragaman genetik pada 5 isolat *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin dengan metode RAPD. Persentase polimorfik dari isolat- isolat tersebut antara 66,67%-100% atau rata-rata 80,28%, dengan hasil analisis UPGMA menghasilkan dendogram dengan koefisien kekerabatan 0 – 30% atau terdapat keragaman 70 – 100%. Disarankan perlu penelitian lanjut untuk mendapatkan fragmen DNA yang spesifik dengan sampel yang lebih banyak, yang kemudian akan di sekuensing untuk mendapatkan urutan nukleotida sehingga dapat dikembangkan untuk menjadi penanda bagi *Mycobacterium tuberculosis* sensitif INH dan rifampisin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2007 , *Penyakit Tuberkulosis*. [http:// www. Medicastro.com](http://www.Medicastro.com) , diakses 26 Januari 2008.
- Anonim , 2008. *Makassar Memiliki Penderita TB terbanyak di Sulsel*, [http : // www. Kompas.com](http://www.Kompas.com), diakses 28 Januari 2008
- Anonim, 2009. *Identifikasi Keragaman Genetik *Gonystylus bancanus* dengan penanda RAPD*. [http // www.docstoc.com](http://www.docstoc.com), di akses 29 Oktober 2009.
- Cole, S.T, Eisenach K.D, Mc Murray D.N and Jacobs, 2005. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, ASM Press.
- Depkes.RI , 2002. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*, Jakarta.
- FKUI, 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*, Jakarta.
- Jawetz, Melnick, Adelberg, 2001. *Mikrobiologi Kedokteran Buku 1*. Terjemahan oleh Bagian Mikrobiologi FK Unair. 2005. Salemba Medika, Jakarta.
- Girsang M, 2002. **Pengobatan Standar Penderita TBC**. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran No 137 hal : 6-8*
- Godman and Gilman, 2001. *Dasar Farmakologi dan Terapi Volume 2*, Terjemahan oleh tim Sekolah Farmasi ITB. 2008, EGC, Jakarta.
- Habibah N, 2009. Beberapa tipe teknik PCR. <http://google.co.id> diakses 28 Oktober 2009
- Halim F.H, 2006. **Panduan OAT Pada Pengobatan Tuberkulosis**. *Jurnal Tuberkulosis Indonesia Volume 4*, PPTI, Jakarta.
- Harn. H.J, K.L. Shen, LI Ho, KW Yu, GC Liu, KC Yueh anf JH Lee, 1997. **Evidence of transmission of *Mycobacterium Tuberculosis* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei City, Taiwan**. *J. Clin.Pathol*, 50 ; 505 – 508
- Hofling C.C, Pavan E.M, Giampaglia C.M.S, *et al.* 2005. **Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid – resistant *Mycobacterium Tuberculosis* isolates from Brazil**, *Int J Tuberc Lung Dis* 9 (1) : 87-93
- Homolka. S, Post. E, Oberhauser. B, George A.G, *et al.* 2008. **High Genetic Diversity Among *Mycobacterium tuberculosis* complex strain from Sierra Leone**, *BMC Microbiology*, 8 : 103 doi : 10. 1186
- Jain A, Mondal R, Prasad R, 2008. **Prevalence of multidrug resistant *Mycobacterium Tuberculosis* in Lucknow**, *Journal Med.Res* , 128 (3) : 300 – 6.

- Jou. R, Chen Y.H, Chiang. C.Y, Yi M.C, *et al*, 2005. **Genetic Diversity of Multydrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates and Identification of 11 Novel *rpo B* Alleles in Taiwan**, *Journal of clinical Microbiology* Vol.43, No.3, p. 1390-1394.
- Korzekwa K, K. Polok, and R. Zielinski, 2006. **Application of DNA markers to estimate genetic diversity of *Mycobacterium Tuberculosis* strains**, *Pol. J. Microbiol.* 55 (1) : 19 - 24
- Katzung.B, 2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik Edisi 3*, Terjemahan oleh Bagian Farmakologi FK Unair, 2004. Salemba Medika, Jakarta.
- Kim B.J, Lee K.H, Park B.N, Kim S.J, *et al* . 2001. **Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputa by Nested PCR-Linked Single-Strand Conformation Polymorphism and DNA Sequencing**, *Journal of Clinical Mirobiology* : 2610-2617
- Ma X, Wang H, Deng Y, Liu Z., Xy Y., Pan X., Musser JM and Graviss EA, 2006. ***rpoB* mutations and molecular characterization of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong Province, China**, *J.Clin. Microbiol*, 44 (9) : 3409-3412
- Mordechai, E., 1999. *Application of PCR The methodologies in Molecular Diagnostic*. Burlington Country, USA.
- McGregor C.E, C.A Lambert, M.M. Gyrling J.H. Louw and L. Warnich. 2000. **A Comparison Assesment of DNA Finger Printing Technique (RAPD, ISSR, AFLP, and SSR) in Tetraploid Potato**. *Uphytica* (113) : 135-144
- Nikolayevsky V, Brown T, Balabanova Y, Ruddy M, *et al*. 2004. **Detection of Mutations Associated with Isoniazid and Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Samara Region, Russian Federation**, *Journal of Clinical Microbiology* : 4498-4502
- PPDI,2006. *Tuberkulosis : Pedoman Diagnosis danPenatalaksanaan di Indonesia*, Perhimpunan Dokter Paru Indonesia,Jakarta.
- Rafalski,J.A, Tingedan S.V, and William J.G.K, 1991. RAPD Markers a New Technology for Genettic Mapping and Plant Breeding. *Ag.Btech New and Information* 3 : 645-648
- Richner S.M, Meiring J, Kirby R, 1997. **A Study of the Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from patients in the Eastern Province of South Africa using Random Amplified Polymorphic DNA profiling**, *Journal Electrophoresis* Vol.18 Issues 9, pages : 1570 – 1576.
- Saiki R.K, 1989. The Design and Optimization of the PCR, Pages : 7-16 in Erlich, H.A (ed) PCR Technology. Principle and application for DNA Amplification.
- Sambrook J.T. and Miniatis, 1989. *Molecular Cloning. A. Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press. P. 13.1 – 13.10
- Sjahrurachman A, 2008. *Kultur dan Uji Kepekaan M.tuberculosis terhadap Obat Anti Tuberkulosis Lini Pertama*, Depkes R.I
- Singh, JPN, R. Verma and P. Chaudhuri. 2006. **Random amplified polymorphic DNA analisys of *Mycobacterium Tuberculosis* strain in India**, *J. Vet.Sci.*7 (2) ; 181 -187

- Singh H.B, Chauhan D.S, Das.R, *et al* , 2002. **Rapid Discrimination of Indian Isolates of *M.tuberculosis* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis – A Preliminary Report**, *Indian Journal of Medical Microbiology Vol 20 No 2*, p: 69 -71
- Suryanto. D. 2003, **Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler**,*J.Mikrobiol. Indon.8. (In pres)*
- Stavrum R, Valvatne H, Bo T.H, Jonnasen I, *et al*, 2008. **Genomic Diversity among Beijing and non Beijing *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Myanmar**, PLoS ONE 3 (4): e 1973. doi : 10.1371
- Tazi.L, B. Kreiswirth, C. Carriere and M. Tibayrenc, 2002, **Molecular epidemiology of *Mycobacterium Tuberculosis* and its relevance to the surveilance and control of TB : an e-date**, *Infec. Genet. Evollll. 2 ; 153 -158*
- Tazi L, J.E Baghdadi, S. Lesjean, *et al.*2004. **Genetic Diversity and population Structure of *Mycobacterium Tuberculosis* in Cassablanca, a Morrocan City with High Incidence of tuberculosis**, *J.Clin.Microbiol.42 (1) ; 461-466*
- Viska.O, 2007. **Extensively Drug Resistance-Tuberculosis (XDR-TB)**, *Jurnal Tuberkulosis Indonesia Volume 5*, PPTI, Jakarta.
- Wahyunitisari, 2005. **Uji Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk menilai kebijakan klinis Penentuan Diagnosis Tuberkulosis Paru di rumah sakit DR. Sutomo Surabaya**, (on line), [http: // adln.lib.unair.ac.id](http://adln.lib.unair.ac.id), diakses 29 Januari 2009.
- Wikipedia. 2006. *Elektroforesis*. <http://en.wikipedia.org/wiki/elektroforesis> , diakses 28 Oktober 2009.
- WHO, 2007. *Global Tuberkulosis Control Surveillance, Planning, Financing*
- Yuwono. T, 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction, Panduan Eksperimen PCR untuk Memecahkan Masalah Biologi Terkini*, Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Yusron,E. 2005. **Pemanfaatan Keragaman Genetik dalam Pengelolaan Sumberdaya Hayati Laut**. *Oseana Vol,XXX No 2*.