

PENANDAAN DNA DENGAN ^{32}P UNTUK DETEKSI RESISTENSI *Mycobacterium tuberculosis* TERHADAP ISONIAZID

SOFIATI PURNAMI*, MUKH SYAIFUDIN*, DAN GIYATMI**
*Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN Jakarta

Jl. Lebak Bulus Raya No 49 Jakarta 12070

Telp. 021.7513906 Faks 7657950

**Sekolah Tinggi Teknologi Nuklir, BATAN Yogyakarta

Jl. Babarsari Kotak Pos 6101/YKBB Yogyakarta 55281

Telp. 0274.484085 Faks 489715

Abstrak

PENANDAAN DNA DENGAN ^{32}P UNTUK DETEKSI RESISTENSI *Mycobacterium tuberculosis* TERHADAP ISONIAZID. Telah dilakukan penandaan DNA dengan ^{32}P untuk deteksi resistensi *M.tuberculosis* terhadap isoniazid dengan teknik biologi molekuler berbasis nuklir. Tuberkulosis (TB) menempati urutan pertama penyebab kematian akibat penyakit infeksi di Indonesia. Salah satu penyebab sulitnya pengendalian TB adalah merebaknya *M.tuberculosis* yang resisten terhadap isoniazid. Dalam penelitian ini resistensi isoniazid dideteksi dengan menganalisis gen *inhA* yang merupakan salah satu penyandi resistensi isoniazid. Analisis dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mengamplifikasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) dari gen *inhA* sekaligus dilabel dengan alfa ^{32}P *deoxy cytosin triphosphat* ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$). DNA hasil amplifikasi dianalisis dengan teknik *single strand conformation polymerism* (SSCP) yang didasarkan pada perubahan mobilitas pita DNA dalam gel poliakrilamid setelah divisualisasi dengan autoradiografi. Hasil analisis terhadap 100 sampel yang diuji, diketahui bahwa 13,0% sampel diduga resisten terhadap isoniazid. Teknik biologi molekuler dapat digunakan untuk mendeteksi resistensi secara lebih cepat dan sensitif, serta dapat digunakan sebagai data pendukung pengobatan pasien TB. Perubahan mobilitas pita DNA gen *inhA* dapat digunakan untuk analisis resistensi *M.tuberculosis* terhadap isoniazid.

Kata kunci : *M.tuberculosis*, isoniazid, resistensi, *inhA*, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, PCR, SSCP

Abstract

DNA LABELED WITH ^{32}P FOR DETECTION OF THE RESISTANCE OF *Mycobacterium tuberculosis* TO ISONIAZID. DNA labeled by ^{32}P for detection of the resistance of *M.tuberculosis* to isoniazid has been carried out with molecular biology technique based on nuclear science. Tuberculosis (TB) is the first rank of death caused infectious diseases in Indonesia. One case of difficulties in controlling TB is the spreading of *M.tuberculosis* which resistant to the drug such as isoniazid. In

this research, resistance to isoniazid can be detected by analyzing *inhA* gene, which is encoding isoniazid resistance. Analysis was done with *polymerase chain reaction* (PCR) technique to amplify *deoxyribonucleic acid* (DNA) from *inhA* gene and was labeled with alpha ^{32}P *deoxy cytosine triphosphate* ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$). Amplified product of DNA was analyzed with *single strand conformation polymerism* (SSCP) technique based on the alteration of DNA band mobility in acrylamide gel after visualization with autoradiography. Analyses that have been done on 100 samples, it was found that 13.0% of them were suspected resistant to isoniazid. Molecular biology technique could be used to detect resistance in a short time and specific, and could be used as supporting data in TB patient treatment. The alteration of mobility of DNA band *inhA* gene could be used for analyzing the resistance *M.tuberculosis* to isoniazid.

Keywords : *M.tuberculosis*, isoniazid, resistance, *inhA*, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, PCR, SSCP

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang sudah sangat lama ditemukan, namun tetap menjadi permasalahan kesehatan di dunia serta penyebab kematian utama di negara-negara berkembang^[1,2]. Menurut catatan WHO tahun 1998, Indonesia menempati urutan ketiga jumlah penderita TB setelah India dan Cina, dan merupakan penyakit yang merakyat sehingga perlu pengendalian cermat, akurat dan berkesinambungan antara lain dengan pemberian obat anti tuberkulosis. Usaha lain yang dimulai tahun 40-an dalam melawan penyakit ini adalah dengan sanatorium, kolaps paru, dan kemoterapi. Di awal tahun 1990 TB kembali merebak di Indonesia dan masih merupakan penyebab kematian nomor dua setelah penyakit jantung dan pembuluh darah. Bahkan TB menduduki peringkat pertama penyakit menular penyebab kematian. Jumlah penderitanya sekitar 500.000 orang/tahun dengan angka kematian sekitar 175.000 orang/tahun atau satu orang setiap empat menit, khususnya di daerah pedesaan dan perkotaan yang kumuh^[2,3].

Isoniazid termasuk obat lini pertama pengobatan TB dan telah digunakan selama lebih dari 40 tahun. Isoniazid mampu menghambat sintesis asam mikolat dinding sel yang merupakan komponen utama amplop *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*). Isoniazid saat ini direkomendasikan untuk mencegah TB pada kelompok pasien *human immunodeficiency virus* (HIV) dan anak-anak yang tinggal bersama penderita TB paru. Bukti-bukti genetik menunjukkan bahwa mutasi gen-gen *katG*, *inhA*, *ahpC*, *oxyR* dan *kasA* merupakan penyebab kekebalan terhadap isoniazid, dengan persentase mutasi pada gen *katG* sebesar 60-70%, dan selebihnya pada gen lain.

Teknik deteksi infeksi dan keganasan secara konvensional yang saat ini digunakan ternyata memiliki beberapa kelemahan yakni lambat, prosedurnya sulit dan panjang, serta kurang sensitif/spesifik. Metode molekuler yang meliputi *polymerase chain reaction* (PCR) diikuti dengan *single strand conformation polymorphism* (SSCP) menggunakan *probe* (pelacak) bertanda ^{32}P radioaktif, merupakan metode yang cepat dan akurat untuk mendeteksi resistensi kuman patogen. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa metode radioaktif ternyata lebih sensitif daripada metode non radioaktif. Oleh karenanya, deteksi dini dengan metode tersebut akan membantu terapi yang tepat pada penderita TB resisten isoniazid dan mengurangi resiko kematian penderita^[4,5].

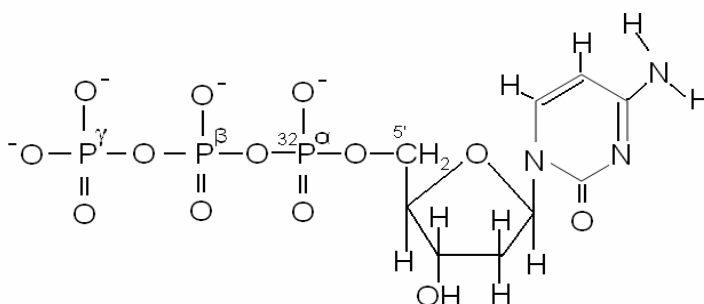
Identifikasi yang akurat terhadap spesies *mycobacterium* penyebab TB akan menjamin keberhasilan pengobatan. Salah satu tantangan yang menyebabkan sulitnya pengendalian TB adalah merebaknya kuman *M.tuberculosis* yang resisten terhadap obat seperti isoniazid. Resistensi isoniazid dapat dideteksi dengan menganalisis bagian gen *inhA* dan *kasA* yang menjadi sasaran intraseluler isoniazid. Dalam penelitian ini bagian gen penyandi resistensi *M.tuberculosis* terhadap isoniazid dianalisis dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) diikuti dengan *single strand conformation polymorphism* (SSCP) menggunakan *probe* (pelacak) bertanda ^{32}P radioaktif. Diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan untuk menentukan pengobatan secara lebih efektif serta dapat mendukung hasil diagnosis sehingga memperkecil risiko kematian penderita.

Fenomena merebaknya resistensi obat primer (MDR-TB) merupakan fokus program internasional penanggulangan TB sebagai penyebab utama kematian di dunia dimana diagnosis dini dan identifikasi sangat diperlukan untuk efisiensi pengobatan dan mengontrol strain MDR^[6]. Resistensi terhadap isoniazid menyebabkan pengobatan menjadi lebih lama untuk pasien TB, dan kecil keberhasilannya jika isolat juga resisten terhadap rifampisin (MDR-TB).

Teknik nuklir dapat digunakan untuk melengkapi teknik diagnosis konvensional, dan dapat dikatakan unik/spesifik dan memiliki beberapa kelebihan karena lebih sensitif, serta dapat digunakan untuk membantu memantau penyebaran penyakit infeksi, mengidentifikasi resistensi organisme dengan lebih cepat dan lebih murah, mengetahui aktivitas suatu obat dan mendeteksi organisme yang sangat agresif dan menyebabkan penyakit yang serius^[7,8]. Dalam hal ini, teknik nuklir secara *in vitro* seperti radioimmunoassay (RIA), dan teknik molekuler dengan PCR dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan zat-zat patogen^[8].

Metode molekuler radioaktif secara *in vitro* juga dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi secara dini. Suatu penyakit baik akibat infeksi atau ketidaknormalan genetik dapat didiagnosis dengan mendeteksi kespesifikan deret asam nukleatnya (blok-blok penyusun gen) untuk setiap jenis penyakit. Metode molekuler yang meliputi PCR dengan *probe* (pelacak) bertanda ^{32}P radioaktif merupakan metode yang cepat dan akurat untuk mengidentifikasi zat patogen, dan bahkan dapat digunakan untuk menentukan strain suatu patogen. PCR mampu menggandakan DNA atau RNA sampai 1 juta kali atau lebih dan dapat dengan mudah diukur menggunakan pelacak asam nukleat bertanda radioaktif untuk mengidentifikasi fragment DNA. Teknik ini sangat sensitif dan spesifik serta akurat untuk mendeteksi sejumlah kecil patogen seperti TB, dan jauh lebih cepat daripada teknik konvensional, serta dapat mencegah keganasan dan risiko kematian pasien karena dapat ditangani secara dini (IAEA, 2000). Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa meskipun relatif mahal, metode radioaktif ternyata lebih sensitif daripada metode non radioaktif.

Pada penandaan DNA, radioisotop yang digunakan adalah ^{32}P karena merupakan pemancar beta dengan anak luruh bersifat stabil, serta dapat menggantikan fosfor pada gugus fosfat DNA. Untuk memudahkan reaksi penandaan, radioisotop ^{32}P yang digunakan biasanya berbentuk senyawa kimia, misalnya $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Gambar 1) dimana ^{32}P dengan mudah dapat menggantikan fosfor pada gugus fosfat pada rantai nukleotida di posisi alfa dari struktur molekul DNA.



Gambar 1. Isotop ^{32}P Dalam Gugus Alfa *Deoxy Cytocin Tri Phosphat*^[9]

TATA KERJA

Pengumpulan Sampel

Sampel berupa sputum BTA positif sebanyak 100 dari pasien tuberculosis, diperoleh dari Perkumpulan Pemberantasan Tuberculosis Indonesia (PPTI) Jl. Baladewa Pasar Senen Jakarta Pusat mulai bulan Juli hingga Desember 2005. Seluruh pasien dari PPTI diduga menderita tuberculosis berdasarkan hasil diagnosis BTA positif pewarnaan Ziehl-Neelsen.

Isolasi DNA *M. tuberculosis*

Ekstraksi DNA dilakukan pada 100 sampel sputum dengan prosedur seperti dilakukan oleh Boom dkk^[10]. Lima ratus mikroliter sputum didekontaminasi dengan larutan *N*-acetyl L-cysteine NaOH-Na-sitrat dan dikocok dengan *horizontal gyrotary shaker* selama 20 menit dan kemudian disentrifuga pada 12.000 rpm selama 10 menit. Setelah dicuci dengan akuadest, ke dalam pelet ditambahkan 100 µl larutan TE (Tris – EDTA), 900 µl pelisis guanidine tiosianat (GuSCN) dan 20 µl suspensi diatom, kemudian dikocok kembali selama 10 menit dan disentrifuga pada 12.000 rpm selama 2 menit. Setelah dicuci 2 kali dengan larutan dapar pencuci dan etanol 70% dingin dan satu kali dengan aseton, pelet dikeringkan pada suhu 56°C. Ke dalam pelet ditambahkan larutan TE, diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit dan setelah disentrifuga, supernatannya digunakan untuk *template* PCR. Seluruh prosedur inokulasi dan ekstraksi DNA dilakukan dalam *biological safety cabinet*.

Amplifikasi dan Penandaan DNA dengan *polymerase Chain Reaction*

Sepasang primer oligonukleotida gen *inhA* yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA diambil dari *Genebank M. Tuberculosis*, yaitu pada segmen gen *inhA* satu dengan oligonukleotida 5'-GCGAGCTATATCTCCGGTGCG-3' (*forward*) dan 5'-TAAGCTTCTCCAGGAACGGCC-3' (*reverse*) dengan suhu *annealing* 60°C.

Amplifikasi dilakukan dalam tabung premix PCR komersial (AccuPower PCR PreMix, Bioneer) yang mengandung *Taq* polymerase 2U, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), dan MgCl₂ 1,5 mM dan primer oligonukleotida *inhA* masing-masing 20 pmol, dan kemudian volume dibuat menjadi 20 µl. Satu mikroliter (0,1-0,5 µCi) [α -³²P]dCTP (Amersham International) ditambahkan ke dalam campuran reaksi serta dilakukan PCR. Kontrol positif adalah DNA dari strain standard *M. tuberculosis* (H37Rv) dan kontrol negatif adalah akuabidest steril. Amplifikasi dilakukan pada *automated thermal cycler* dengan siklus meliputi denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit

diikuti 40 siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 30 detik, dan ekstensi primer pada suhu 72°C selama 45 detik, serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Pencampuran dan proses PCR dilakukan dengan peralatan proteksi yang memadai^[11].

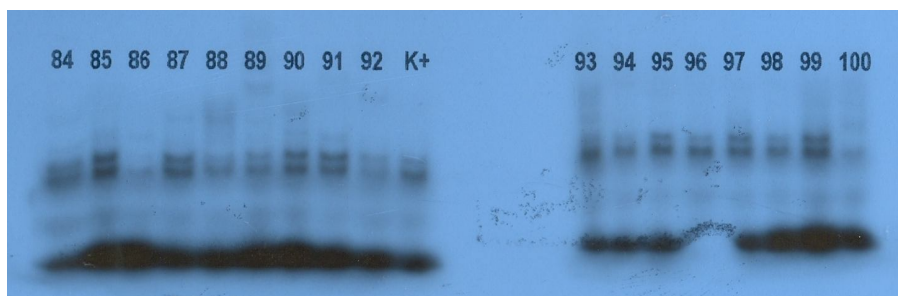
Analisis Single Strand Conformation Polymerism Radioaktif Untuk Deteksi Mutasi Gen

Analisis SSCP radioaktif dilakukan pada 100 sampel hasil amplifikasi DNA positif. Sebanyak 7 µl produk PCR bertanda ³²P dicampur dengan 7 µl SSCP *loading dye* (95% formamide (Biorad) dan 5% 10X *blue juice*). Sampel didenaturasi pada 95°C dengan cara dipanaskan menggunakan air mendidih selama 4-5 menit, kemudian diletakkan di atas es serta dielektroforesis pada gel poliakrilamid 7,5% pada tegangan 100 volt, suhu kamar, selama 45 menit - 1 jam. Setelah dielektroforesis, gel diambil dan dilekatkan pada kertas saring untuk kemudian dilakukan autoradiografi. Visualisasi dilakukan dengan merendam film yang telah terkena paparan DNA bertanda ³²P dalam larutan pengembang dan fiksasi masing-masing selama 8,5 dan 10 menit. Dari perubahan mobilitas DNA yang dapat dilihat pada film, akan dapat diketahui adanya mutasi gen *inhA* yang menunjukkan adanya resistensi terhadap isoniazid.

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Sebanyak 100 sampel sputum BTA positif dianalisis *Mycobacterium*-nya melalui penelusuran gen *inhA* segmen satu dengan metode PCR-SSCP radioaktif. Dari hasil analisis, diketahui bahwa 13 sampel DNA (13%) diduga resisten terhadap isoniazid. Berdasarkan perubahan mobilitas pita DNA pada gel poliakrilamid, sampel yang diduga resisten terhadap isoniazid adalah nomor 8, 9, 10, 15, 25, 33, 47, 57, 67, 75, 82, 93, dan 100

Contoh hasil autoradiografi dari proses PCR-SSCP pada 100 sampel dapat dilihat pada Gambar 2. Bila pita-pita DNA melebar atau menebal mungkin hal ini disebabkan karena konsentrasi [α -³²P]dCTP yang ditambahkan terlalu besar dan waktu pemajanan terlalu lama. Sedangkan jika konsentrasi dikurangi, gambar pita DNA menjadi sangat tipis sehingga pita DNA tidak jelas perubahannya. Pada visualisasi pita DNA gen *inhA* (Gambar 2), terlihat bahwa pita-pita DNA hasilnya lebih jelas bila konsentrasi isotop ³²P yang ditambahkan sekitar 0,1 µCi/µl dengan konsekuensi waktu pemajanan menjadi lebih lama



Gambar 2. Hasil SSCP Terhadap Sampel Nomor 84-100 dan Kontrol Positif (K+), dengan Sampel Nomor 93 dan 100 Diduga Mengandung Mutasi *inhA*

Dari 100 sampel yang DNA-nya diamplifikasi dengan PCR, terlihat bahwa ada 5 sampel (nomor 20, 29, 42, 60 dan 78) yang tidak tergambar pitanya. Hal ini memberikan arti bahwa sensitifitas PCR yang digunakan adalah 95%. Perlu diketahui bahwa apabila PCR tidak memberikan hasil, maka hal ini kemungkinan karena sampel tidak mengandung DNA dari gen *inhA* sebagai akibat suhu *annealing* saat proses PCR belum sesuai, atau sampel tidak mengandung ekstrak DNA *M.tuberculosis*.

Dalam penelitian ini yang dianalisis hanya gen *inhA* segmen 1 yang tentunya belum representatif untuk seluruh gen *inhA*, sehingga masih diperlukan analisis terhadap gen *inhA* segmen lain. Selain itu, perlu dilakukan pula analisis terhadap gen-gen *katG*, *ahpC*, *oxyR* dan *kasA* yang juga merupakan gen penyandi resistensi terhadap isoniazid, sehingga data yang diperoleh lebih lengkap untuk mendukung diagnosis resistensi terhadap isoniazid.

Tahapan awal dari isolasi DNA dilakukan dengan melakukan dekontaminasi sputum, hal ini dimaksudkan agar bakteri tidak terkontaminasi bakteri lain. Selanjutnya dilakukan ekstraksi sputum untuk mendapatkan *M.tuberculosis*. Proses ini dilakukan di dalam *biological safety cabinet* (BSC) untuk mencegah kontaminasi terhadap bakteri maupun kontaminasi terhadap pekerja. Pada BSC, aliran udara dihisap ke atas sedangkan udara yang masuk dilewatkan pada suatu filter, sehingga diharapkan tidak ada kontaminasi pada sampel maupun pekerjanya.

Pada proses PCR, keberhasilan amplifikasi DNA dengan PCR ditentukan oleh beberapa faktor yaitu : kemurnian dan konsentrasi komponen dalam larutan premix PCR, primer oligonukleotida gen, konsentrasi [α - 32 P]dCTP, jumlah dan kemurnian DNA sampel sputum, faktor teknis dan non teknis misalnya kontaminasi.

Sampel yang telah diperoleh dari mesin PCR kemudian dielektroforesis. Karena sampel telah ditandai dengan ^{32}P yang merupakan pemancar beta, maka proses elektroforesis dilakukan dalam perisai *flexyglass*. Elektroforesis DNA pada gel poliakrilamid merupakan teknik yang dapat diandalkan untuk memisahkan molekul DNA menurut ukurannya.

Gel poliakrilamid yang berisi sampel dan telah dielektroforesis, selanjutnya dimasukkan ke dalam kaset film untuk proses autoradiografi. Autoradiografi dilakukan dengan waktu antara 12-48 jam, bergantung pada jumlah konsentrasi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ yang ditambahkan atau aktivitas ^{32}P . Semakin besar konsentrasi yang ditambahkan semakin sedikit waktu autoradiografi.

Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil autoradiografi ; (1) jumlah DNA yang terekstrak dalam sampel, bila jumlah DNA sedikit maka yang tertandai juga sedikit; (2) aktivitas ^{32}P yang ditambahkan; dan (3) waktu pemajanan. Dalam penelitian ini hasil autoradiografi belum maksimal, karena konsentrasi ^{32}P yang ditambahkan belum tepat dengan lama waktu pemajanan. Efisiensi autoradiografi tergantung pada energi emisi radioaktif.

Dalam penelitian ini dari 100 sampel yang dianalisis, diduga 13% sampel mengandung mutasi gen *inhA* yang resisten terhadap isoniazid. Hasil ini sedikit lebih tinggi dari data RS Persahabatan tahun 1993 yang menunjukkan kuman *M.tuberculosis* resisten isoniazid sebesar 7,7%^[3]. Hasil penelitian lain yang mirip dengan hasil penelitian ini adalah penelitian mengenai prevalensi resistensi isoniazid di propinsi DKI Jakarta, Sumatera Barat dan Sulawesi Selatan yang berkisar antara 11,9% dan 15,6%^[12]. Untuk memastikan jenis mutasi yang terjadi sebagai penyebab resistensi masih diperlukan teknik *sequencing* untuk mengetahui perubahan urutan basa. Hal ini belum dilakukan karena tidak ada fasilitas yang tersedia.

Dalam penelitian ini mutasi gen *inhA* yang merupakan penyandi resistensi terhadap isoniazid dilihat berdasarkan mobilitas pita DNA dalam gel poliakrilamid. Pita-pita DNA sampel dilihat perbedaannya terhadap kontrol positif, sampel yang pita DNA-nya berbeda terhadap kontrol positif diduga resisten terhadap isoniazid. Kontrol positif adalah *M.tuberculosis* (H37Rv) yang telah ditambahkan primer gen *inhA* segmen satu dan ditandai dengan $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Perbedaan satu pasang basa dalam sampel akan memberikan hasil yang berbeda pada mobilitas pita-pita DNA. Dari perbedaan ini diketahui bahwa gen telah bermutasi. Untuk mengetahui jenis mutasi yang terjadi, atau di daerah mana mutasi terjadi, diperlukan teknik *sequencing*. Mutasi dalam gen *inhA* akan memperkecil efektifitas isoniazid dan mutasi struktural atau promotor protein pembawa *enoil acyl reductase*

yang dikode oleh *inhA* yang akan mengubah interaksi sasaran obat ini dengan isoniazid.

Pada biologi molekuler, penggunaan radioisotop untuk deteksi resistensi memberikan hasil yang lebih sensitif dibandingkan metode non radioaktif. Untuk amplifikasi DNA dengan PCR menggunakan metode radioisotop memberikan hasil 10 kali lebih baik daripada non radioisotop, sedangkan pada PCR-SSCP dengan radioisotop hasilnya 8 kali lebih baik daripada non radioaktif^[13].

KESIMPULAN

Berdasar penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil bahwa resistensi *M.tuberculosis* terhadap isoniazid dapat dideteksi dengan metode biologi molekuler menggunakan pengamatan perubahan mobilitas pita DNA dengan *probe* bertanda radioaktif ³²P. Diantara 100 sampel yang dianalisis dengan metode PCR-SSCP radioaktif diperoleh data bahwa 13 pasien diduga resisten terhadap isoniazid.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO, 2002, Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning and Financing, WHO Report, WHO/CDS/TB/2002, 295.
2. ADITAMA, T.Y., 2003, Tuberkulosis kini, masa datang & penanggulangannya, Seminar Nasional *Quality assurance programme for molecular-based diagnosis of Hepatitis C and tuberculosis*, Jakarta 19 Juni 2003.
3. BASRI, C., 2003, Program nasional pemberantasan tuberkulosis, Seminar Nasional *Quality assurance programme for molecular-based diagnosis of Hepatitis C and tuberculosis*, Jakarta.
4. PORTILLO, D., THOMAS, M.C., MARTINEZ, E., MARANON, C., VALLADARES, B., PATARROYO, M.E., and LOPEZ, M.C., 1996, Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples, *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1996, p.324-328.
5. KLEMEN, H., BOGIATZIS, A., GHALIBAFIAN, M., and POPPER, H.H., 1998, Multiplex polymerase chain reaction for rapid detection of atypical mycobacteria and *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Diagn. Mol. Pathol.* 7, 1998, p.310-316.
6. SAJDUDA, A., BRZOSTEK, A., POPLAWSKA, M., AUGUSTYNO-WICZ-KOPEC, E., ZWOLSKA, Z., NIEMANN, S., DZIADEK, J., and HILLEMANN, D., 2004, Molecular characterization of rifampisin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland, *J. Clin.Microbiol.* Vol.42 (6), 2425-2431

7. TELENTI, A., HONORE, N., BERNASCONI, C., MARCH, J., ORTEGA, A., HEYM, B., TAKIFF, H.E., and COLE, S.T., 1997, Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level, *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 719-723.
8. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2000, Combating infection in developing countries, Vienna Austria.
9. LEHNINGER, A.L., 1994, Dasar-dasar Biokimia, Erlangga, Jakarta.
10. BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E., and VAN DER NOORDAA, J., 1990, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.* 28(3), 1990, p.495-503.
11. SYAIFUDIN, M., dan ROSILAWATI, M., 2005, Identifikasi *M. tuberculosis* dengan PCR dupleks dan analisis resistensinya dengan SSCP radioaktif, Prosiding Presentasi Ilmiah Keselamatan Radiasi dan Lingkungan XI, Jakarta, p.168-182.
12. ALAMSYAH, B., 2003, Epidemiologi genetik serta faktor risiko *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten INH dan atau rifampisin, Desertasi Program Doktor Ilmu Kesehatan Masyarakat, Program Pascasarjana, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia, 2003.
13. LEE, H., JOHNSON, R., BANG, H.E., JORDAAN, A.M., DAR, L., KHAN, B.K., VICTOR, T.C., CHO, S.N., 2006, Comparison between Radioisotopic and Non-radioisotopic Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymerism (PCR-SSCP) Procedures in the Detection of Mutations at *rpoB* Gene Associated with Rifampisin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *World J Nucl Med* 5:241-247