

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* Yang Berhubungan Dengan Resistensi Rifampisin

The Identification of *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* Gene Mutation That Associate with Rifampicin Resistance

Ella Amalia¹, Maghfiroh Rahayu Nindatama², Lusia Hayati³, dan Dwi Handayani⁴

1. Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
2. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
3. Departemen Biologi Medik Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
4. Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

Alamat Korespondensi: maghfirohrahayu@yahoo.co.id

Abstrak

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin sudah banyak dilaporkan di dunia termasuk Indonesia. Resistensi terhadap rifampisin pada *M. tuberculosis* sebagian besar disebabkan mutasi gen *rpoB* yang menyandi RNA polymerase subunit β . Mutasi gen *rpoB Ser531Leu* yang berhubungan dengan resistensi terhadap Rifampisin paling sering terjadi. Adanya mutasi pada *rpoB* akan menyebabkan perubahan pada struktur dan aktivitas target obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi mutasi gen *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* pada sampel yang diambil dari penderita tuberkulosis paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif terhadap 40 penderita tuberkulosis paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Identifikasi mutasi gen *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan teknik *Multiplex Polymerase Chain Reaction* menggunakan primer *rpoB531*. Dari 40 isolat gen *rpoB* kodon 531 didapatkan 70% (21 dari 30) terjadi mutasi, *wild type* sebanyak 9 isolat (30%) dan isolat yang tidak menghasilkan pita sebanyak 10 isolat. Telah ditemukan mutasi gen *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* pada penderita tuberkulosis paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, resistensi, rifampisin, gen *rpoB Ser531Leu*

Abstract

Tuberculosis is a contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* rifampicin resistance cases were numerous reported in the world including Indonesia. The most common rifampicin resistance in *M. tuberculosis* caused by *rpoB* gene mutation that code RNA polymerase subunit β . *RpoB Ser531Leu* gene mutation that associate with Rifampicin resistance is the most common. This mutation will cause the structure and drug target activity change. This research aimed to identify *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* gene mutation of sample that taken from pulmonary tuberculosis patient at RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. This research is a descriptive research to 40 pulmonary tuberculosis patients at RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Identification of *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* gene mutation was done by using *Multiplex Polymerase Chain Reaction* technique with *rpoB531* primer. Out of 40 codon 531 *rpoB* gene isolates, identified 70% (21 of 30) mutation, *wild type* in 9 isolates (30%) and non-amplification isolates in 10 isolates. *rpoB Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* gene mutation of pulmonary tuberculosis patient in RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang was found.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, resistance, rifampicin, *rpoB Ser531Leu* gene

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. TB merupakan penyakit infeksi penyebab kematian tertinggi kedua di dunia setelah HIV¹. Tuberkulosis merupakan masalah kesehatan global. Pada tahun 2012 terdapat 8,6 juta kasus baru dan 1,3 juta meninggal karena tuberkulosis. Di dunia, angka kejadian tuberkulosis adalah 12.000 per 100.000 orang dan angka kematian sebesar 940 per 100.000 orang. Di Indonesia, prevalensi tuberkulosis sebesar 730 per 100.000 orang dan angka kematian adalah 67 per 100.000 orang². Di Sumatera Selatan terdapat 8.702 kasus TB dan 5.838 basil tahan asam (BTA) positif dan di Palembang terdapat 2.438 kasus baru TB dan 1.613 BTA positif³.

Tingginya angka kejadian TB menjadi lebih kompleks akibat munculnya resistensi terhadap obat antituberkulosis (OAT)⁴. Pengobatan primer untuk infeksi *Mycobacterium* adalah kemoterapi spesifik. Dua obat utama untuk mengobati tuberkulosis adalah rifampisin dan isoniazid⁵. WHO telah mendefinisikan adanya *multidrug resistant* TB (MDR-TB) yaitu penyakit tuberkulosis yang disebabkan oleh strain *M.tuberculosis* yang resisten sekurang-kurangnya terhadap isoniazid dan rifampisin, OAT lini pertama yang paling efektif. Di Indonesia diperkirakan telah terjadi 5100 kasus MDR-TB dari kasus TB baru yang tercatat pada tahun 2010. Hal ini membuat Indonesia masuk dalam daftar negara dengan masalah MDR-TB yang serius (*high burden MDR-TB country*)⁶. Resistensi dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak tepat dan tidak teratur⁷. Kepatuhan pasien yang buruk terhadap pengobatan adalah faktor utama yang menyebabkan resistensi obat selama terapi⁵.

Salah satu obat utama tuberkulosis adalah rifampisin. Rifampisin menghambat pertumbuhan bakteri dengan berikatan secara kuat pada RNA polimerase dependen-DNA bakteri, sehingga menghambat sintesis RNA bakteri⁵. Resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin adalah salah satu komponen kunci untuk penentuan terapi dengan OAT⁷. Timbulnya resistensi terhadap obat pada *M. tuberculosis* disebabkan mutasi random pada kromosom bakteri. Proses mutasi tersebut terjadi secara spontan⁸.

Resistensi terhadap rifampisin pada *M. tuberculosis* sebagian besar (> 95%) disebabkan mutasi gen *rpoβ* yang menyandi RNA polymerase subunit β pada 81 *hot spot region*⁷. Subunit β dikode oleh gen *rpoB* dan memiliki fungsi dalam pengikatan nukleotida dan mengikat senyawa penghambat transkripsi seperti pada antibiotik rifampisin. Adanya mutasi pada *rpoB* akan

menyebabkan perubahan pada struktur dan aktivitas target obat⁹. Sampai saat ini sudah diidentifikasi adanya substitusi asam amino Serin (TCG) menjadi Leusin (TTG) pada kodon 531 (Ser531Leu) (42 %)¹⁰. Apabila terjadi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin, maka pemberantasan tuberkulosis menjadi lebih sulit⁷.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk membuktikan adanya mutasi gen *rpoβ* pada *M. tuberculosis* dan hubungannya dengan kegagalan atau resistensi pengobatan rifampisin. Uji sensitivitas terhadap rifampisin dengan teknik in vitro dan in vivo diberbagai daerah menunjukkan adanya resistensi terhadap rifampisin dan dari semua isolat yang resisten tersebut membawa alel mutan dari gen *rpoB* kodon 531 (Ser531Leu)¹¹. Di Palembang belum tersedia data mengenai adanya mutasi gen *rpoB* pada *M. tuberculosis*. Identifikasi terhadap mutasi gen *rpoB* kodon 531 pada *M. tuberculosis* ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai terjadinya kegagalan atau resistensi pengobatan tuberkulosis terhadap rifampisin di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang.

Metode

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional dengan rancangan penelitian laboratorium untuk mengidentifikasi mutasi gen *rpoB* kodon 531 pada *M. tuberculosis* dengan menggunakan teknik *multiplex* PCR. Penelitian dimulai dari bulan Oktober 2014 hingga Januari 2015. Pemilihan sampel pada penelitian ini menggunakan metode *consecutive sampling*. Jumlah sampel dalam penelitian ini sebanyak 40 sampel. Sampel dalam penelitian ini adalah 12 penderita TB paru yang berobat di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang dalam kurun waktu Oktober 2014 hingga November 2014 yang memenuhi kriteria inklusi dan 28 arsip sampel berupa isolat DNA dari sputum penderita TB paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang yang dikumpulkan dari Oktober 2013 sampai Maret 2014.

Isolasi DNA dilakukan dengan metode ekstraksi DNA *Chelex-100* yang menggunakan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* pH 7,4; Saponin 0,5% dalam PBS; dan *Chelex 20%* dalam ddH₂O pH 10,5. Tahap pencucian sputum menggunakan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* pH 7,4 sebanyak 3 kali. Kemudian tambahkan 0,5% saponin dan diinkubasi di dalam es selama 5 menit dan mendapatkan hasil yang baik maka inkubasi campuran tersebut dilakukan pada suhu 20°C selama semalam. Keesokan harinya campuran disentrifugasi dan lakukan pencucian menggunakan

Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4 sebanyak 2-3 kali dan supernatan dibuang selanjutnya ditambahkan *Chelex 20%* dalam ddH₂O pH dan 100 µl ddH₂O. Kemudian campuran diinkubasi dalam air mendidih, setelah itu disentrifugasi dan rebus kembali selama 5 menit lalu lakukan sentrifugasi. DNA akan berada pada bagian supernatan (*DNA containing water*). Kemudian ambillah bagian supernatant dan disimpan pada suhu -20°C.

Tahapan setelah isolasi DNA adalah mendeteksi *IS6110* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Pada proses ini digunakan primer *forward* 5'-CTCGTCCAGCGC-CGCTTCGG-3' dan primer *reverse* 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3' yang menghasilkan pita berukuran 130 bp¹². Proses PCR menggunakan suhu 95°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 1 siklus yaitu 20 detik pada suhu 95°C, 6 menit pada suhu 45°C, dan suhu 72°C selama 2 menit. Dilanjutkan dengan siklus berulang 30 kali yaitu 95°C selama 20 detik, 62°C selama 1 menit, dan suhu 72°C selama 4 menit.

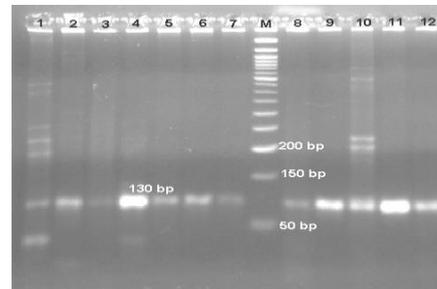
Sampel yang terbukti terdapat *M. tuberculosis*, akan dilakukan pemeriksaan lanjutan dengan pemeriksaan multiplex PCR untuk mengidentifikasi mutasi pada gen *rpoB* kodon 531. Identifikasi mutasi pada gen *rpoB* kodon 531 menggunakan primer *forward* 5'-GTCGCC GCGATCAAGGA-3' dan primer *reverse* 5'-TGACCCGCGCGTACAC -3 dan primer *inner* 5'-ACAAGCGCCGACTGTC -3'. Multiplex PCR ini menggunakan tahapan tertentu, yaitu didenaturasi denaturasi awal menggunakan suhu 96°C selama 3 menit, kemudian 5 kali siklus pada suhu 95°C selama 45 detik, 60°C selama 1 menit, dan 72°C selama 30 detik. Setelah itu 5 siklus pada suhu 95°C selama 40 detik, 59°C selama 50 detik dan 72°C selama 30 detik. Kemudian 25 siklus pada 94°C selama 50 detik, 55°C selama 40 detik dan 70°C selama 30 detik, dengan tahap elongasi terakhir pada suhu 72°C selama 3 menit¹³.

Tahap selanjutnya setelah pemeriksaan multiplex PCR adalah elektroforesis. Elektroforesis dengan voltase sebesar 80 V selama 60 menit dan menggunakan gel agarosa 2% yang mengandung ethidium bromida 10%, setelah itu dilakukan visualisasi untuk melihat apakah terjadi mutasi pada isolat yang diteliti.

Pada non mutan "*wild type*" produk PCR akan menghasilkan dua pita yaitu pada 167 bp dan pada 249 bp. Adanya mutasi pada produk PCR akan menghasilkan satu pita pada 249 bp dan digolongkan "*mutant*"¹³.

Hasil

Amplifikasi gen spesifik *M. tuberculosis* menggunakan primer *IS6110* menghasilkan satu pita pada 130 bp (Gambar 1). Amplifikasi gen spesifik *M. tuberculosis* dengan metode PCR untuk memastikan adanya bakteri *M. tuberculosis* dalam sputum sebagai penyebab TB paru. Visualisasi hasil amplifikasi gen spesifik *M. tuberculosis* menggunakan gel agarosa 4% yang mengandung ethidium bromida 10% dan dielektroforesis dengan voltase sebesar 80 V selama 70 menit. Seluruh sampel yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan satu pita pada 130 bp.



Gambar 1. Visualisasi Hasil Digesti Gen Spesifik *M. tuberculosis*

Keterangan:

M : Marker/penanda ukuran DNA

1-12 : Sampel isolat *M. tuberculosis*

Semua sampel yang mengandung DNA *M. tuberculosis* kemudian dilanjutkan dengan Multiplex PCR untuk mengetahui ada atau tidaknya mutasi yang terjadi pada gen *rpoB Ser531Leu*. Deteksi mutasi pada gen *rpoB Ser531Leu* menggunakan primer *rpoB531*. Primer *rpoB531* akan mengenali dan memotong sekuens alel yang *wild type* dan menghasilkan dua pita yaitu pada 167 bp dan pada 249 bp. Adanya mutasi pada produk PCR akan menghasilkan satu pita pada 249 bp. Mutasi ini disebabkan perubahan pada sekuens nukleotida, sehingga primer yang spesifik untuk gen *rpoB Ser531Leu* tidak dapat mengenalinya. Visualisasi dilakukan dengan gel agarosa 2% yang mengandung ethidium bromida 10% dan dielektroforesis dengan voltase sebesar 80 V selama 60 menit. Hasil visualisasi dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil Visualisasi gen *rpoB Ser531Leu*

Keterangan:

- M : Marker/penanda ukuran DNA
 1-7 : Sampel isolat *M. tuberculosis*
 3, 6, 7 : *Uncut*/sampel yang tidak terpotong
 2, 4, 5 : Sampel bergenotip mutan
 1 : Sampel bergenotip *wild type*

Tabel 1. Frekuensi Mutasi Gen *rpoB*

<i>Ser531Leu</i>			
Jumlah Isolat	Positif Amplifikasi	Jumlah Alel Mutan	Persentase Mutasi (%)
40	30	21	70

Tabel 2. Distribusi Genotip Gen *rpoB*

<i>Ser531Leu</i>		
Genotip	Jumlah	Persentase (%)
<i>rpoB Ser531</i>	9	30
<i>rpoB Leu531</i>	21	70
Total	30	100

Frekuensi mutasi genotip gen *rpoB Ser531Leu* yang berhubungan dengan resistensi Rifampisin di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang dari 40 isolat menunjukkan positif amplifikasi sebanyak 30 isolat, alel mutan sebanyak 21 isolat dan persentase mutasi sebesar 70%. Data frekuensi mutasi dan distribusi genotip gen *rpoB Ser531Leu* yang berhubungan dengan resistensi Rifampisin di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang ditunjukkan dalam tabel 1 dan tabel 2.

Hasil penelitian dari 40 isolat gen *rpoB* kodon 531 menunjukkan sebanyak 70% (21 dari 30) terjadi mutasi, *wild type* sebanyak 9 isolat (30%) dan isolat yang tidak menghasilkan pita sebanyak 10 isolat.

Pembahasan

Dari hasil penelitian terdapat mutasi gen *rpoB* sebanyak 70% (21 dari 30). Hal ini menunjukkan sudah terjadi mutasi gen *rpoB* kodon 531 pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosa sebagai penderita TB Paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Pada penelitian ini terdapat 10 isolat yang tidak menghasilkan pita setelah dilakukan Multiplex PCR. Kemungkinan isolat tersebut tidak menghasilkan pita disebabkan oleh degradasi DNA target atau perubahan susunan nukleotida gen *rpoB* yang mengakibatkan suhu *annealing* pada proses PCR penelitian ini tidak sesuai untuk isolat tersebut¹⁴.

Di Polandia, prevalensi mutasi pada kodon 531 sebesar 32,4%¹⁵. Di Cina, mutasi pada kodon 531 sebanyak 35% di Provinsi Guangxi Zhuang dan 50% di Provinsi Jilin¹⁶. Di Iran, mutasi pada kodon 531 (*Ser531Leu*) sebanyak 6,78%¹⁷. Di Indonesia, dari 9 isolat klinik yang dilakukan sekuensing fragmen *rpoB531* menunjukkan sebanyak 4 isolat terjadi mutasi pada kodon 531 (*Ser→Leu*), 4 isolat

terjadi mutasi pada kodon lain, dan *wild type* sebanyak 1 isolat⁷.

Di seluruh dunia, mutasi yang paling sering adalah *Ser-531-Leu*^{15,18}. Uji sensitivitas terhadap rifampisin dengan teknik *in vitro* dan *in vivo* diberbagai daerah menunjukkan adanya resistensi terhadap rifampisin dan dari semua isolat yang resisten tersebut membawa alel mutan dari gen *rpoB* kodon 531 (*Ser531Leu*)¹¹. Sampai saat ini sudah diidentifikasi adanya substitusi asam amino Serin (TCG) menjadi Leusin (TTG) pada kodon 531 (*Ser531Leu*) (42 %) ¹⁰. Dari 12 isolat yang mengalami mutasi pada kodon 531, ditemukan 7 isolat terjadi perubahan pada TCG→TTG (*Ser→Leu*) dan 5 isolat pada TCG→TTC (*Ser→Phe*)¹⁹.

Penelitian yang terkait dengan mutasi gen *rpoB* kodon 531 *M. tuberculosis* yang berhubungan dengan resistensi rifampisin di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang belum pernah diteliti sebelumnya. Pada penelitian ini terdapat mutasi gen *rpoB* sebanyak 70%. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan Elbir *et al* pada tahun 2014 di Sudan sebesar 61,5% dan penelitian yang dilakukan Bahramand *et al* pada tahun 2009 di Iran sebesar 58,3%. Hasil ini juga berbeda dengan penelitian yang dilakukan Bostanabad *et al* pada tahun 2007 di Iran sebesar 6,78% dan penelitian yang dilakukan Freitas *et al* pada tahun 2014 di Iran sebesar 7%.

Rifampisin berikatan dengan subunit β RNA polymerase dependen-DNA yang dimiliki bakteri sehingga menghambat sintesis RNA. Resistensi terjadi akibat salah satu dari beberapa mutasi titik pada *rpoB*, gen untuk subunit β RNA polymerase. Telah diketahui bahwa resistensi terhadap RIF terjadi akibat mutasi pada segmen 81-bp gen *rpoB* dari kodon 507-533 yang disebut sebagai *Rifampicin Resistance Determining Region* (RRDR)²⁰. Penyebab resistensi rifampisin juga dapat terjadi pada gen *rpoB* kodon 531, 513, atau 526, dan sebagian kecil ditemukan pada posisi 514 dan 533²¹.

Perubahan RNA polymerase akibat mutasi kromosom yang terjadi dengan frekuensi tinggi⁵. Timbulnya resistensi terhadap obat pada *M. tuberculosis* juga disebabkan mutasi random pada kromosom bakteri. Proses mutasi tersebut terjadi secara spontan⁸. Resistensi terhadap rifampisin pada *M. tuberculosis* sebagian besar (> 95%) disebabkan mutasi gen *rpoB* yang menyandi RNA polymerase subunit β ⁷. Adanya mutasi pada *rpoB* akan menyebabkan perubahan pada struktur dan aktivitas target obat⁹.

Ada beberapa faktor yang menyebabkan resistensi rifampisin dalam pengobatan TB paru. Faktor utama yang menyebabkan resistensi obat

selama terapi adalah kepatuhan pasien yang buruk terhadap pengobatan⁵. Kepatuhan pasien yang buruk terhadap pengobatan dapat menyebabkan timbulnya efek samping obat TB paru. Faktor penyebab resistensi selain kepatuhan pasien adalah status nutrisi seseorang yang berhubungan dengan fungsi sistem kekebalan tubuh. Nutrisi yang buruk dapat menyebabkan tingkat obat serum sub-terapi tidak responsif dan mempengaruhi penyerapan obat²¹. Resistensi dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak tepat dan tidak teratur⁷. Resistensi juga dapat disebabkan oleh pengobatan yang tidak adekuat dan tidak sesuai atau "mono therapy" (terapi satu obat) juga penggunaan obat yang tidak sesuai standar yang sudah ditetapkan. Secara proses biologik alamiah, daya tahan mikroba dapat melakukan upaya resistensi. Upaya resistensi ini dapat ditransmisikan secara genetik ketika diobati dengan suatu antimikroba atau penolakan (ekspulsi) fisik obat tersebut²¹.

Kesimpulan

Mutasi gen *rpoB Ser531Leu* ditemukan pada isolat *M. Tuberculosis* yang diisolasi dari sputum penderita TB Paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Distribusi mutasi genotip gen *rpoB Leu531 M. tuberculosis* sebanyak 70% dan distribusi genotip non-mutan (*wild type*) gen *rpoB Ser531 M. tuberculosis* sebanyak 30% pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita TB paru di Rumah Sakit dr. Mohammad Hoesin Palembang.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Multidrug-resistant Tuberculosis (MDR-TB) 2010. Geneva.
2. World Health Organization. 2013. Global Tuberculosis Report 2013. Geneva.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.. Data dan Informasi Tahun 2013: Profil Kesehatan Indonesia. Jakarta, Indonesia, 2014.
4. Wijaya MD, Rusyanthini EP, Pradnyaniti DG, Komalasari KT, Sunarti LPSS. Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Isolat *Mycobacterium tuberculosis Multidrug Resistant* dengan Metode *Nested Polymerase Chain Reaction* 2006.
5. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, and Adelberg (Ed 23 rd). Terjemah oleh: Hartanto, H, et al. EGC, Jakarta, Indonesia, 2008: 325-333.
6. Wijaya, M. D, Rusyanthini E. P, Pradnyaniti D. G, Komalasari K.T, Sunarti L.P.S.S. Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Isolat *Mycobacterium tuberculosis Multidrug Resistant* dengan Metode *Nested Polymerase Chain Reaction*. 2006.
7. Lina, M. R. Deteksi resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap rifampisin berdasarkan mutasi gen *rpoβ* (RNA polymerase sub unit β) dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*), *Jurnal Respirologi Indonesia* 2007; 27(3):161-166.
8. Lina MR. Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan resistensinya terhadap rifampisin dengan metode *nested polymerase chain reaction* (PCR) dan *sequencing*, *Universa Medicina* 2007; 26(1):1-10.
9. Yuwono T. Biologi Molekuler. Erlangga, Jakarta, Indonesia, 2005.
10. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998; 79(1):3-29.
11. Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Maeda MK, et al. Whole-Genome Sequencing of Rifampicin-Resistant *M. Tuberculosis* Strains Identifies Compensatory Mutations In RNA Polymerase. *Nat Genet* 2012; 44(1):106–110.
12. Khosravi AD, Goodarzi H, Alavi SM. Detection of genomic mutations in *katG*, *inhA* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(1):57-62.
13. Noviana H, Nurachman Z, Ramdani M, Noer A. Multiplex PCR for rapid detection of Rifampin and Isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Bandung, Indonesia. *Microbiol Indones* 2007; 1(3):114-118.
14. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Allele-specific *rpoB* PCR assays for detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(7):2231-2235.
15. Pauluch-Oles' J, Koziol-Montewka M, Magrys' A. Mutations in the *rpoB* gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Eastern Poland. *New Microbiologica* 2009; 32:147-152.
16. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, Wang H. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(5):2209-2212.
17. Bostanabad SZ, Fateh A, Seyedi K, Abdolrahimi F, Karimi, Tasbiti AH, et al. Frequency and molecular characterization of rifampicin-resistance in *rpoB* region of Multiple Drug Resistance (MDR) isolates from tuberculosis patients in southern endemic region of Iran. *Iranian Journal of Biotechnology* 2007; 5(4):212-217.
18. Sharma M, Sethi S, Mishra B, Sengupta C, Sharma SK.. Rapid Detection of Mutations in *rpoB* Gene of Rifampicin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by Line Probe Assay. *Indian Journal Medical Research* 2003; 117:76-80.
19. Bahrmand, AR, Titov LP, Tasbiti AH, Yari S, Gravis EA. High-Level Rifampin Resistance Correlates with Multiple Mutations in the *rpoB* Gene of Pulmonary Tuberculosis Isolates from the Afghanistan Border of Iran. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9):2744-2750.
20. Chambers, H. F.. Obat Antimikobakterium. Dalam: B. G. Katzung (Ed.). *Farmakologi Dasar dan Klinik* (Ed 10 rd). Terjemah oleh: A. W. Nugroho, L. Rendy, and L. Dwijayanti. EGC, Jakarta, Indonesia, 2010: 796-798.
21. Syaifudin M, Rosilawati M, Irawan H, Bela B. Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dan analisis mutasi gen *rpoB* dan *katG* penyebab resistensi ganda dengan teknik molekuler. Laporan Penelitian Balitbang BATAN. Jakarta, 2007:1-15.