

KONSTRUKSI MUTASI DAERAH RESISTEN RIFAMPIN (GEN *rpoB*) DARI *Mycobacterium leprae* PADA PENDERITA LEPRO DI SURABAYA MELALUI ANALISIS GENOM HASIL PCR

E Bimo Aksono H

Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga, Surabaya - Jawa Timur
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115
e-mail : baksono@yahoo.com

ABSTRACT

Rifampin is a key component in the chemotherapeutic regimens used to combat both leprosy and tuberculosis. Owing to exquisite rifampin susceptibility of *Mycobacterium leprae*, this drug is the backbone of the multidrug therapy currently recommended by WHO for the treatment of leprosy. Resistant mutant are known to arise in leprosy patients receiving rifampin (RIF) monotherapy. The aim of this study was to elucidation of the sequence of the *M. leprae* *rpoB* gene permitted identification of mutations associated with rifampin resistance of leprosy patients in Surabaya by genome analysis. *M. leprae* was detected by nested PCR. In brief, PCR was run with the sense primer *rpoBF* and anti sense primer *rpoBR* for 45 cycles. Amplified DNA was analyzed by 3% agarose electrophoresis and the 342 base pairs product was visualized by UV fluorescence after staining with ethidium bromide. PCR product will be purified by phenol-chloroform methods and then sequencing directly by ABI PRISM 310. After that sequence data from samples will be analyzed by Genetic Mac ver. 8.0, and comparing with reference data from Gen bank. The result show that only six of 10 samples could be analyzed construct of mutations by Genetic Mac ver 8.0. They have construct no mutation or 100% homology with reference (Z14314 or GI:44382)

Key words: rifampin, *rpoB* gene, sequencing, genome analysis, PCR

PENGANTAR

Berdasarkan rekomendasi dari WHO, salah satu jenis pengobatan dalam program *multidrug therapy* adalah rifampin, meskipun demikian pada beberapa penderita lepra kurang peka terhadap rifampin dan diduga adanya strain *M. leprae* yang resisten. Di sisi lain lamanya pertumbuhan dari *M. leprae* pada media merupakan masalah bagi penelitian kasus resistensi di laboratorium (Brosch *et al.*, 2000).

Tahun 1970-an rifampin diperkenalkan pertama kali dan merupakan pilihan pengobatan yang paling penting sebagai pengobatan penyakit lepra (Musser, 1995). Beberapa literatur menunjukkan bahwa target obat rifampin terletak pada *sub-unit beta* dari *DNA dependent RNA Polymerase*, yang selanjutnya diketahui sebagai gen *rpoB*. Adanya perubahan urutan nukleotida (mutasi) pada daerah tersebut dianggap bertanggung jawab terjadinya kasus resistensi (Williams *et al.*, 1994; Honore dan Cole, 1993; Telenti *et al.*, 1993 dan Levin dan Hatful, 1993).

Kapur *et al.* (1994) melaporkan bahwa DNA dari daerah gen *rpoB* telah dapat diidentifikasi sejumlah 306 pasangan basa dengan menggunakan teknik PCR, apabila dilanjutkan dengan teknik sekuensing terlihat bahwa terdapat beberapa urutan nukleotida yang mengalami mutasi yang kemudian dikaitkan dengan kejadian resisten dari strain kuman *Mycobacterium leprae*.

Penelitian genetik terhadap strain *E. coli* yang resisten terhadap rifampin pertama kali dilakukan pada tahun 1980-an, yaitu dikaitkan dengan adanya *missence mutation* dan *short deletion* di daerah gen *rpoB* (Ovchinnikov *et al.*, 1983). Beberapa tahun kemudian, Jin dan Gross (1988) melaporkan bahwa terjadi mutasi pada 17 nukleotida yang mempengaruhi ekspresi 14 asam amino dari *subunit α RNA polymerase E. coli* yang diduga berperan dalam timbulnya kasus resistensi.

Tujuan penelitian ini untuk memperoleh informasi tentang bagaimana cara mengisolasi dan mengidentifikasi daerah resisten rifampin serta membuat gambaran konstruksi mutasi yang terjadi di daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) pada *Mycobacterium leprae* dari penderita kusta di Surabaya - Jawa Timur melalui analisis genom hasil PCR. Informasi yang cepat tentang kepekaan suatu obat merupakan hal yang terpenting sebagai upaya pengobatan terhadap suatu individu terutama penyakit-penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium* dengan menggunakan rifampin.

BAHAN DAN CARA KERJA

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di *Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga Kampus C Unair Jl. Mulyorejo

Surabaya. Waktu penelitian berlangsung dari bulan April sampai dengan Agustus 2004.

Subjek dan Koleksi Sampel

10 sampel penderita lepra yang telah dikoleksi oleh kelompok studi lepra pada *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga Kampus C Unair Jl. Mulyorejo Surabaya. *Pernasal swab* yang digunakan berasal dari *Medical Wire dan Equipment Co.* untuk keperluan mengoleksi sampel dari penderita kusta.

Pembuatan Suspensi dan Isolasi Kuman

Sampel hasil *blade* dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang berisi PBST sejumlah 600 μ l lalu divortex selama 5 menit dan *blade* diambil, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm pada temperatur 4 °C selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil pemusingan kemudian dibuang dan pelet yang diperoleh dikeringkan kemudian ditambah dengan 5 μ l DW, kemudian diukur kadar dan kemurniannya dengan spektrofotometer.

Deteksi Gen *rpoB* dari Kuman *M. leprae* dengan Teknik PCR

Semua suspensi kuman sebelum dianalisis disimpan pada suhu -80 °C. 40 ml serum tersebut kemudian di sonikator untuk mendapatkan pelet DNA. Semua suspensi kuman dilakukan deteksi terhadap kuman *M. leprae* menggunakan metode *nested PCR* dengan mesin *PCR Thermal Cycler* dari Perkin-Elmer. Pemeriksaan PCR menggunakan primer yang spesifik yang dirancang dari daerah *gen rpoB* (*rpoBF*: 5'-caggacgtcgagcgatcac-3' dan *rpoBR*: 5'-cagcgtcaagtattcgatc-3') dan PCR dirancang hanya sekali jalan untuk 45 siklus. Cetakan DNA dari kuman *M. leprae* masing-masing dengan volume 0,25 μ l ditambah dengan 24,75 μ l campuran larutan yang mengandung aquabidestilata 7,75 μ l, 2 \times premix G 22,5 μ l, primer *rpoBF* dan *rpoBR* masing-masing 1 μ l, *Taq polimerase* (Perkin Elmer Cetus) 0,25 μ l. Campuran reaksi ditempatkan pada *microcentrifuge* 0,7 ml kemudian ditambahkan *mineral oil* (Sigma) sebanyak 2 tetes di atas permukaan campuran larutan tersebut untuk menghindari terjadi proses penguapan selama PCR. Tabung tersebut kemudian diletakkan pada mesin PCR (Perkin-Elmer) yang dirancang untuk sekali jalan selama 45 siklus yaitu tahap *pre-heat* 94 °C selama 4 menit dilanjutkan dengan denaturasi 94 °C selama 30 detik, tahap *annealing* 55 °C selama 30 detik dan tahap ekstensi 72 °C selama 30 detik, lalu ditambah tahap pemanjangan 72 °C selama 5 menit sehingga akhirnya diperoleh DNA dengan panjang nukleotida sekitar 420 pasangan basa.

Untuk visualisasi produk dari PCR yang merupakan DNA dari kuman *M. leprae* hasil amplifikasi dengan panjang 420 pasangan basa nukleotida bersama kontrol positif, kontrol negatif serta menggunakan *marka fX 174/Hae digest* atau *MW Marka 4*, selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel agarose 3% dalam larutan *buffer* 0,5% yang mengandung *ethidium bromide*. Hasil elektroforesis dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet, untuk dokumentasi dilakukan pewarnaan dengan perak nitrat kemudian agar dapat disimpan sebagai dokumentasi (Gambar 1).

Pemurnian dan Sekuensing

Produk PCR yang diperoleh dari tahap sebelumnya, segera dilakukan pemurnian dengan *purification kit* (Amersham). Untuk keperluan sekuensing maka diperlukan proses pelabelan dengan *big dye terminator kit*. Sekuensing dilakukan dengan mesin *ABI-Prism tipe 310* (tipe kapiler) terhadap 10 sampel.

Analisis Data

Data sekuens yang diperoleh dari tahap sebelumnya dianalisis konstruksi mutasi dengan program *Genetic Mac version 8.0*. Sebagai bahan pembanding menggunakan isolat *M. leprae* dari referensi yang terdapat pada *Genbank*.

HASIL

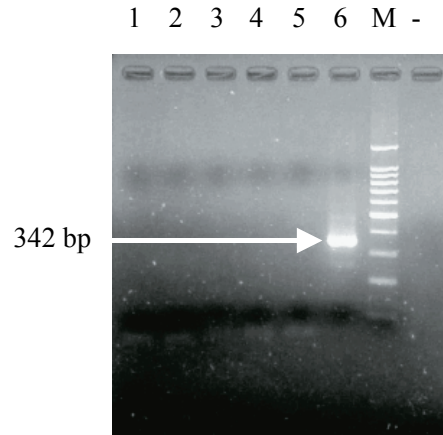
Pada penelitian untuk mengetahui daerah resisten rifampin pada penderita lepra di Surabaya - Jawa Timur ini digunakan *nested PCR* dengan demikian produknya lebih spesifik. Adapun pasangan primer yang digunakan dalam PCR adalah *rpoBF* dan *rpoBR* yang dilakukan untuk satu kali jalan dengan 45 siklus. Oleh karena primer yang digunakan merupakan hasil suatu rancangan baru sehingga perlu adanya optimasi suhu pada PCR dan diharapkan dari PCR ini diperoleh 342 pasangan basa nukleotida setelah melalui tahap elektroforesis, sebagai petanda digunakan marka 100 bp *ladder* (Takara Bio Inc.) (Gambar 1).

Dari hasil penelitian memperlihatkan bahwa ada 10 penderita lepra, dengan PCR memiliki *band* yang positif terhadap *gen rpoB* yang berperan menimbulkan kasus resistensi (Gambar 1) dengan panjang nukleotida 342 pasangan basa dan hasil ini sesuai dengan yang diharapkan. Ini berarti hasil rancangan primer tersebut (*rpoBF* dan *rpoBR*) dapat digunakan untuk mendeteksi *gen rpoB* pada kuman *M. leprae*.

Sepuluh sampel yang telah dinyatakan positif dengan PCR berbasis daerah *gen rpoB*, setelah dilakukan pemurnian dan pelabelan dan dilanjutkan dengan sekuensing ternyata hanya enam sampel yang dapat dianalisis urutan

nukleotidanya. Dari enam sampel ternyata memperlihatkan tidak adanya perbedaan atau perubahan pada konstruksi atau motif urutan nukleotida dengan *M. leprae* yang digunakan sebagai referensi dari data *Genbank* (Z14314 atau GI :44382) (Gambar 2).

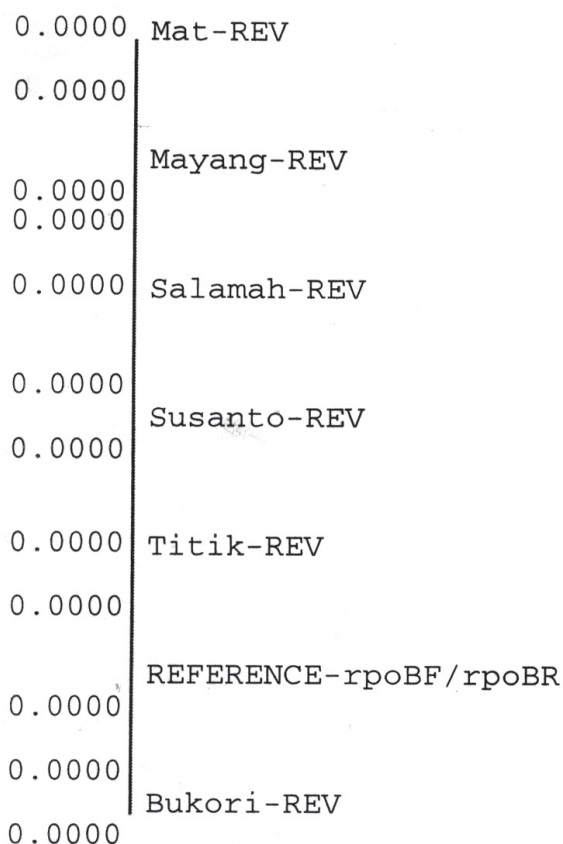
Untuk melihat kekerabatan dengan isolat lain terutama yang telah dilaporkan pada *Genbank*, maka dilakukan analisis pohon filogenetik dengan program Genetic Mac version 8.0 juga memperlihatkan bahwa semua kuman *M. leprae* yang menginfeksi penderita kusta di Surabaya berasal dari strain yang sama (Gambar 3).



Gambar 1. Produk PCR sekitar 342 pasangan basa Nukleotida terlihat sebagai band pada hasil elektroforesis dengan agarose gel 3%

Bukori-REV	1:	GCCGCAGACGCTGATCAATATCCGTC	CGGTTGGTCGCGCGCTATCAAGGAATTC	TTCGGCAC	60
Mat-REV	1:	GCCGCAGACGCTGATCAATATCCGTC	CGGTTGGTCGCGCGCTATCAAGGAATTC	TTCGGCAC	60
Mayang-REV	1:	GCCGCAGACGCTGATCAATATCCGTC	CGGTTGGTCGCGCGCTATCAAGGAATTC	TTCGGCAC	60
Salamah-REV	1:	GCCGCAGACGCTGATCAATATCCGTC	CGGTTGGTCGCGCGCTATCAAGGAATTC	TTCGGCAC	60
Susanto-REV	1:	GCCGCAGACGCTGATCAATATCCGTC	CGGTTGGTCGCGCGCTATCAAGGAATTC	TTCGGCAC	60
Titik-REV	1:	GCCGCAGACGCTGATCAATATCCGTC	CGGTTGGTCGCGCGCTATCAAGGAATTC	TTCGGCAC	60
REFERENCE-rpoBF/rpoBR	1:	GCCGCAGACGCTGATCAATATCCGTC	CGGTTGGTCGCGCGCTATCAAGGAATTC	TTCGGCAC	60
Bukori-REV	61:	CAGCCAGCTGTCGAGTTTCATGGATC	AGAACAACCCCTCTGTCGGGCCTG	ACCCACAAGCG	120
Mat-REV	61:	CAGCCAGCTGTCGAGTTTCATGGATC	AGAACAACCCCTCTGTCGGGCCTG	ACCCACAAGCG	120
Mayang-REV	61:	CAGCCAGCTGTCGAGTTTCATGGATC	AGAACAACCCCTCTGTCGGGCCTG	ACCCACAAGCG	120
Salamah-REV	61:	CAGCCAGCTGTCGAGTTTCATGGATC	AGAACAACCCCTCTGTCGGGCCTG	ACCCACAAGCG	120
Susanto-REV	61:	CAGCCAGCTGTCGAGTTTCATGGATC	AGAACAACCCCTCTGTCGGGCCTG	ACCCACAAGCG	120
Titik-REV	61:	CAGCCAGCTGTCGAGTTTCATGGATC	AGAACAACCCCTCTGTCGGGCCTG	ACCCACAAGCG	120
REFERENCE-rpoBF/rpoBR	61:	CAGCCAGCTGTCGAGTTTCATGGATC	AGAACAACCCCTCTGTCGGGCCTG	ACCCACAAGCG	120
Bukori-REV	121:	CCGGCTGTCGGCGCTGGGCCCGGGT	TGGTTTGTTCGCGTGAGCGTGCCGGG	CTAGAGGTCCG	180
Mat-REV	121:	CCGGCTGTCGGCGCTGGGCCCGGGT	TGGTTTGTTCGCGTGAGCGTGCCGGG	CTAGAGGTCCG	180
Mayang-REV	121:	CCGGCTGTCGGCGCTGGGCCCGGGT	TGGTTTGTTCGCGTGAGCGTGCCGGG	CTAGAGGTCCG	180
Salamah-REV	121:	CCGGCTGTCGGCGCTGGGCCCGGGT	TGGTTTGTTCGCGTGAGCGTGCCGGG	CTAGAGGTCCG	180
Susanto-REV	121:	CCGGCTGTCGGCGCTGGGCCCGGGT	TGGTTTGTTCGCGTGAGCGTGCCGGG	CTAGAGGTCCG	180
Titik-REV	121:	CCGGCTGTCGGCGCTGGGCCCGGGT	TGGTTTGTTCGCGTGAGCGTGCCGGG	CTAGAGGTCCG	180
REFERENCE-rpoBF/rpoBR	121:	CCGGCTGTCGGCGCTGGGCCCGGGT	TGGTTTGTTCGCGTGAGCGTGCCGGG	CTAGAGGTCCG	180
Bukori-REV	181:	TGACGTGCACCCTTCGCACTACGGCC	GGATGTGCCCGATCGAGACTCCGGAG	GGCCCCGAA	240
Mat-REV	181:	TGACGTGCACCCTTCGCACTACGGCC	GGATGTGCCCGATCGAGACTCCGGAG	GGCCCCGAA	240
Mayang-REV	181:	TGACGTGCACCCTTCGCACTACGGCC	GGATGTGCCCGATCGAGACTCCGGAG	GGCCCCGAA	240
Salamah-REV	181:	TGACGTGCACCCTTCGCACTACGGCC	GGATGTGCCCGATCGAGACTCCGGAG	GGCCCCGAA	240
Susanto-REV	181:	TGACGTGCACCCTTCGCACTACGGCC	GGATGTGCCCGATCGAGACTCCGGAG	GGCCCCGAA	240
Titik-REV	181:	TGACGTGCACCCTTCGCACTACGGCC	GGATGTGCCCGATCGAGACTCCGGAG	GGCCCCGAA	240
REFERENCE-rpoBF/rpoBR	181:	TGACGTGCACCCTTCGCACTACGGCC	GGATGTGCCCGATCGAGACTCCGGAG	GGCCCCGAA	240
Bukori-REV	241:	CATAGGTCTGATCGGTTTCATTTGTC	GGTGTACGCGCGGGTCAACCCCTTC	CGGGTTTCATCGA	300
Mat-REV	241:	CATAGGTCTGATCGGTTTCATTTGTC	GGTGTACGCGCGGGTCAACCCCTTC	CGGGTTTCATCGA	300
Mayang-REV	241:	CATAGGTCTGATCGGTTTCATTTGTC	GGTGTACGCGCGGGTCAACCCCTTC	CGGGTTTCATCGA	300
Salamah-REV	241:	CATAGGTCTGATCGGTTTCATTTGTC	GGTGTACGCGCGGGTCAACCCCTTC	CGGGTTTCATCGA	300
Susanto-REV	241:	CATAGGTCTGATCGGTTTCATTTGTC	GGTGTACGCGCGGGTCAACCCCTTC	CGGGTTTCATCGA	300
Titik-REV	241:	CATAGGTCTGATCGGTTTCATTTGTC	GGTGTACGCGCGGGTCAACCCCTTC	CGGGTTTCATCGA	300
REFERENCE-rpoBF/rpoBR	241:	CATAGGTCTGATCGGTTTCATTTGTC	GGTGTACGCGCGGGTCAACCCCTTC	CGGGTTTCATCGA	300
Bukori-REV	301:	AACACCGTACCGCAAAGTGGTTGAC	CGGTGTGGTCAGCGACGA		342
Mat-REV	301:	AACACCGTACCGCAAAGTGGTTGAC	CGGTGTGGTCAGCGACGA		342
Mayang-REV	301:	AACACCGTACCGCAAAGTGGTTGAC	CGGTGTGGTCAGCGACGA		342
Salamah-REV	301:	AACACCGTACCGCAAAGTGGTTGAC	CGGTGTGGTCAGCGACGA		342
Susanto-REV	301:	AACACCGTACCGCAAAGTGGTTGAC	CGGTGTGGTCAGCGACGA		342
Titik-REV	301:	AACACCGTACCGCAAAGTGGTTGAC	CGGTGTGGTCAGCGACGA		342
REFERENCE-rpoBF/rpoBR	301:	AACACCGTACCGCAAAGTGGTTGAC	CGGTGTGGTCAGCGACGA		342

Gambar 2. Analisis hasil multisekuens dari *M. Leprae* isolat Surabaya dan *M.leprae* referensi.



Gambar 3. Analisis pohon filogenetik berbasis gen *rpoB* dari *M. leprae* isolat Surabaya

PEMBAHASAN

Secara konvensional, uji kepekaan rifampin menggunakan *mouse footpads* untuk pertumbuhan kuman sehingga membutuhkan waktu yang cukup lama. Sebagai contoh pada *M. tuberculosis* membutuhkan 2–4 minggu sedangkan pada *M. leprae* membutuhkan waktu bertahun-tahun, oleh karena itu upaya pengembangan metode atau teknik yang cepat, efektif, efisien, dan akurat sangat diperlukan (Cambau *et al.*, 2002; Steiner, *et al.*, 1986; dan Stottmeir, 1976).

Pemeriksaan terhadap DNA suatu kuman memiliki potensi untuk memberikan informasi yang cepat tentang resistensi rifampin, sebab hasilnya ternyata dilaporkan cukup sensitif dan spesifik dibandingkan cara konvensional (Williams *et al.*, 1990; Honore dan Cole, 1993).

Pengembangan pemeriksaan DNA untuk kepentingan diagnosis kasus resistensi rifampin tersebut membutuhkan dasar pengetahuan molekuler dari kuman *Mycobacterium*. Informasi terkini melaporkan bahwa sekuensing dari gen pada *M. leprae* dan *M. tuberculosis* memiliki beberapa mutasi yang dianggap berkaitan dengan penyebab kasus

resistensi terhadap rifampin (Jin dan Gross, 1988; Cambau *et al.*, 2002).

Beberapa literatur menunjukkan bahwa target obat rifampin terletak pada *sub-unit beta* dari *DNA dependent RNA Polymerase*, yang selanjutnya diketahui sebagai gen *rpoB*, yaitu suatu daerah DNA pada kuman *Mycobacterium leprae* sejumlah 306 pasangan basa yang kemudian disebut dengan gen *rpoB*, gen ini sering dikaitkan dengan penyebab kasus resistensi suatu strain *Mycobacterium leprae* terhadap rifampin. Adanya perubahan urutan nukleotida (mutasi) pada daerah tersebut dianggap bertanggung jawab terjadinya kasus resistensi (Williams *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1994; Honore dan Cole, 1993; Telenti *et al.*, 1993; dan Levin *et al.*, 1993).

Penelitian dengan menggunakan *Escherichia coli*, memperlihatkan bahwa mekanisme molekuler dari aktivitas rifampin dipengaruhi oleh *DNA-dependent RNA polymerase* yang selanjutnya dikenal sebagai gen *rpoB*. Gen *rpoB* tersebut telah dapat diidentifikasi, terdiri atas 306 pasangan basa dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction (PCR)* (Gale *et al.*, 1981; Ovchinnikov *et al.*, 1983; Kapur *et al.*, 1994). Enzim ini merupakan suatu senyawa oligomer yang kompleks terdiri atas beberapa subunit antara lain $\alpha, \beta, \beta^1, \delta$ yang dikode oleh gen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, dan *rpoD*. Di mana sebagai intienzim adalah $\alpha_2\beta\beta^1$ atau sebagai holoenzim adalah $\alpha_2\beta\beta^1\delta$. Di mana rifampin kemudian akan berikatan dengan subunit δ dari *RNA polymerase E. coli* sehingga terjadilah proses penghambatan proses transkripsi dari bakteri (McClare dan Chech, 1978).

Honore *et al.* (1993) serta Honore dan Cole (1993) melaporkan bahwa strain mutan dari *M. leprae* diketahui meningkat pada penderita yang menerima pengobatan tunggal rifampin. *Missence mutation* yang terjadi pada Ser-425 pada *M. leprae* (analog dengan Ser-531 pada *M. tuberculosis*), teridentifikasi bahwa terdapat delapan sampel dari sembilan sampel yang mengalami insersi sejumlah enam pasangan basa di daerah yang sama tersebut, sedangkan di daerah His-526 di mana sering terjadi mutasi pada *M. TBC* ternyata tidak ada perubahan pada *M. leprae*.

Dari hasil sekuensing terlihat bahwa tidak adanya perbedaan atau mutasi pada konstruksi atau motif baik pada urutan nukleotida maupun asam amino dari gen *rpoB* *M. leprae* pada penderita lepra di Surabaya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada kelompok studi lepra TDC-Unair serta seluruh anggota kelompok studi lepra TDC-Unair, yang telah memberikan bantuan sampel dari penderita lepra isolat Surabaya - Jawa Timur.

KEPUSTAKAAN

- Brosch R, Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, dan Cole ST, 2000. Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli. *Res. Microbiol.* Vol 151: 135–142.
- Cambau E, Bonnafous P, Perani E, Lougakoff W, Ji B and Jarlier V, 2002. Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. *Clinical Infectious Diseases.* 34: 39–45.
- Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE, Richmond MH, and Waring MJ, 1981. The molecular basis of antibiotic action. John Willey & Sons. Inc. New York.
- Honore N and Cole ST, 1993. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy.* 37(3): 414–418.
- Honore N, Bergh S, Chanteau S, Doncet-populaire F, Eigimeter K, Garnier T, Georges C, Launois P, Limpaboon T, Newton S, Niang K, del Portillo P, Ramesh GR, Reddi R, Ridel PR, Sittisombut N, Hunter SW, and Cole ST, 1993. Nucleotide sequence of the first cosmid from the *Mycobacterium leprae* genome project: Structure and Function of the Rif-Str Regions. *Mole. Microbiol.* 7: 207–214.
- Jin DJ dan Gross CA, 1988. Mapping and sequencing of mutation in the *Escherichia coli* rpoB gene that leads to rifampicin resistance. *J. Mol Biol.* 202: 45–58.
- Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, and Musser JM, 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (gen rpoB) encoding the RNA polymerase B subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1095–1098.
- Levin ME dan Hatful GF, 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol. Microbiol.* 8: 277–285.
- McClare WR dan Chech L, 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 253: 8949–8956.
- Musser J, 1995. Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Review.* 5: 496–514.
- Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Guriev SO, Kalinina NF, Sverdlov ED, Bass AI, Kiver IF, Moiseyeva EP, Igumnov VN, Mindlin SZ, Nikiforov VG, and Khesin RB, 1983. RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli*: Sequence changes and dominance. *Mole. Gen. Genet.* 190: 344–348.
- Steiner P, Rao M, Mitchell M, and Steiner M, 1986. Primary drug-resistant strains of *M. tuberculosis* to rifampin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 446–448.
- Stottmeir KD, 1976. Emergence of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Massachusetts. *J. Infect. Dis.* 133: 88–90.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole ST, Colston MJ, Matter L, Schoolfer K, and Bodmer T, 1993. Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 341: 647–650.
- Williams DL, Gillis TP, and Portaels F, 1990. Geographically distinct isolates of *Mycobacterium leprae* exhibit no genotypic diversity by restriction fragment-length polymorphism analysis. *Mol. Microbiol.* 4: 1653–1659.
- Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nola CM, Abe C, Stich-Groh VS, dan Gillis TP, 1990. Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 38(10): 2380–2386.

Reviewer: **Dr. Ni Nyoman Tri P., MSi.**