

RESISTENSI PRIMER MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DENGAN TARGET Gen *rpoB*

Yunan Jiwintarum, Maruni Wiwin Diarti, Awan Dramawan

Abstract: Detection of primary resistance in sputum samples of patients with pulmonary tuberculosis AFB (+) with molecular analysis on the target *rpoB* gene causes anti-tuberculosis drug resistance (OAT) rifampicin can be beneficial to the holder of a policy program to look for tuberculosis control efforts, one of attempt to overcome these problems is to deliver information about the resistance report in this interval. This research observasional descriptive study, the research variables *Mycobacterium tuberculosis rpoB* gene mutations and patients with pulmonary TB sputum smear (+), with the number of 50 sputum samples with acidental sampling technique. This study results showed all the samples (50 samples) microscopic examination of smear and PCR diagnostics with primary genes and gene Tb1-Tb2 results are positive (+) tuberculosis (100%). By nested PCR amplification techniques to prove that the primary gene *rpoB1* negative results of 23 samples (46%), with the primary gene *rpoB2* negative results in 13 samples (26%). Conclusion: A total of 13 samples (26%) occurred mutation in the gene *rpoB* / is resistant to the antibiotic rifampin.

Kata Kunci: Primer resistance, Sputum, *rpoB* gene, *Mycobacterium tuberculosis*.

LATAR BELAKANG

Tuberculosis (TB) adalah penyebab utama kematian yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri berbentuk batang yang lurus berukuran 0,4 x 3 mikron dan bersifat tahan asam. Tuberculosis (TB) masih merupakan masalah kesehatan diseluruh dunia, oleh karena morbiditas dan mortalitasnya masih tinggi, terutama pada negara yang sedang berkembang. WHO menyatakan TB saat ini telah menjadi ancaman global. Diperkirakan terdapat 8 juta kasus baru dan 3 juta kematian karena TB setiap tahunnya (Arlina G, 2003).

Laporan WHO tahun 1999, Indonesia termasuk dalam kelompok (*high burden countries*), menempati urutan ketiga setelah India dan China. Berdasarkan hasil survei riset kesehatan dasar tahun 2010 pada hasil wawancara anggota rumah tangga

(ART) menunjukkan bahwa periode prevalence TB Paru 2009/2010 berdasarkan diagnose tenaga kesehatan melalui pemeriksaan sputum dan atau foto paru sebesar 725/ 100.000 penduduk. Periode Prevalence TB tertinggi terdapat pada kelompok usia di atas 54 tahun sebesar 3.593 per 100.000 penduduk, sedangkan pada kelompok lain dengan kisaran 348 per 100.000 – 943 per 100.000 penduduk. Lima provinsi yang memiliki angka prevalensi TB Paru paling tinggi adalah : Papua 1.441 per 100.000 penduduk, Banten 1.282 per 100.000 penduduk, Sulawesi utara 1.221 per 100.000 penduduk, Gorontalo 1.200 per 100.000 penduduk dan DKI Jakarta 1.032 per 100.000 penduduk (Badan Litbangkes,2010).

Program kontrol pengobatan tuberculosis yang dikenal dengan program DOTS (*Directly Observed Treatment Shortcourse Chemotherapy*)

diterapkan sebagai strategi kontrol terhadap tuberculosis yang diberlakukan disemua negara terutama negara – negara yang termasuk dalam kelompok *high burden countries* termasuk Indonesia. Di Indonesia, khususnya dalam uji pendahuluan program penatalaksanaan pengobatan TB dengan menggunakan obat anti tuberculosis (OAT) harus diperhatikan KIE yang bersifat komprehensif terhadap penderita dan keluarganya menyangkut berbagai hal yang berkaitan dengan pengobatan yang akan diberikan dan selama pengobatan harus dilakukan dengan pengawasan langsung (Badan Litbangkes,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 isoniazid dan rifampisin. Kekebalan obat ganda ini dalam pengobatan tuberculosis (TB) menjadi masalah masyarakat di sejumlah negara dan merupakan hambatan terhadap program pengendalian TB secara global. Kekebalan bakteri TB terhadap obat anti tuberculosis (OAT) sebenarnya telah muncul sejak lama. WHO pada tahun 2005 melaporkan di dunia lebih dari 400.000 kasus TB –MDR terjadi setiap tahunnya sebagai akibat kurang baiknya penanganan dasar kasus TB dan transmisi strain – strain bakteri yang resisten obat anti TB. TB-MDR muncul akibat akumulasi mutasi penyebab resistensi pada satu obat atau akuisisi unsur – unsur MDR. Menurut WHO, saat ini Indonesia menduduki peringkat ke delapan kasus TB – MDR dari 27 negara. Data awal survei resistensi obat OAT lini pertama yang dilakukan di

Jawa Tengah pada tahun 2006 menunjukkan angka TB-MDR pada kasus baru yaitu 2,07%, angka ini meningkat pada pasien yang pernah diobati yaitu 16,3% (Soedarsono,2010).

Konfirmasi resistensi obat TB sangat perlu dilakukan pada setiap daerah mengingat adanya variasi fenotipe dan genotipe dari *Mycobacterium tuberculosis* disetiap 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 satunya adalah analisis resistensi terhadap rifampisin (RMP).

Rifampisin (RMP) adalah obat antibakteri yang handal dan merupakan komponen standar resimen kombinasi serta obat lini pertama untuk TB karena aktivitasnya yang tinggi melawan *Mycobacterium tuberculosis*. RMP adalah antibiotik semisintetik turunan *Streptomyces mediterranei* yang bersifat bakteriostatik dan bakterisidal serta paling aktif melawan mikroorganisme yang berkembang biak cepat. Munculnya basil *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap obat anti tuberculosis seperti rifampisin mengakibatkan banyak penderita mengalami kekambuhan dan kegagalan pengobatan, sehingga menimbulkan masalah dalam program pemberantasan TB paru.

Provinsi NTB merupakan salah satu dari 33 provinsi yang merupakan daerah indikator pencapaian *Millenium Development Goals* (MDGs) bidang kesehatan pada riset kesehatan dasar (RISKESDAS) tahun 2010. Menurut data Riskesdas 2010 *periode prevalence* TB di NTB 0,927 % dan

periode suspek TB adalah 2,877 % (Riskesdas,2010). Nilai konversi ini menunjukkan keberhasilan tatalaksana kasus TB paru BTA (+) di tentukan dengan melihat nilai konversi. Nilai konversi dihitung dengan adanya perubahan hasil pemeriksaan sputum yang semula positif sebelum pengobatan dan menjadi negatif setelah menjalani pengobatan masa intensif (2 bulan) atau lazim disebut sebagai konversi. Pada pemeriksaan setelah pengobatan sering didapatkan bentuk fragmented yang sering disebut sebagai bangkai bakteri, namun walaupun dalam bentuk fragmented basil *Mycobacterium* belum bisa dikatakan mati karena DNA nya masih aktif, kalau pengobatan dihentikan, bentuk ini bisa menjadi bentuk vegetatif basil yang utuh dan menyebabkan kekambuhan. Hal ini yang memicu terjadinya resistensi terhadap obat anti tuberculosis. Fenomena tersebut bisa dibuktikan dengan pemeriksaan biologi molekuler dengan menganalisis mutasi gen yang mengalami mutasi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif, yaitu mendeteksi adanya mutasi gen *rpoB* pada sputum penderita TB paru baru BTA (+) yang merupakan penyebab resistensi obat anti tuberculosis (OAT) rifampisin. Pemeriksaan biologi molekuler PCR dilakukan di Laboratorium Molekuler Instalasi Litbang – Tekkes Unit Riset Biomedik RSU Provinsi NTB. Bahan dan instrument penelitian yaitu PCR core kit (Promega), Agarose (Invitrogen), Isolat murni *Mycobacterium tuberculosis* sebagai kontrol positif, Marker 174 RF (Invitrogen), Reagen DNA-zol (Invitrogen), Primer

Mycobacterium tuberculosis TB1 dan TB2 untuk primer diagnostik. Primer *Mycobacterium tuberculosis* *rpoB1F-rpoB1R* dan *rpoB2F-rpoB2R* untuk penentuan mutasi gen *rpoB* yang mengkode RNA Polimerase β - subunit yang mengalami resisten terhadap Rifampisin, *Aquadest/aquabidest*, Ethidium bromida (10 mg/ml), EDTA (Sigma 9150133), Asam borak (05250006), Trizma (Lot. 121K5432), *Bromphenol blue*, Etanol absolute, Cat Ziehl – Nelssen, *Machine Biorad Thermal iCycle*, *Mini sub cell power supply PAC* model 1000/500 untuk elektroforesis DNA (Biorad laboratories, California USA), *Gell apparatus* (Biorad), *Elektroforesis apparatus horizontal* (Biorad), *Centrifuge TOMY MC-140* (TOMY Corp, Japan), *Centrifuge Sorvall Biofuge*, Mikro pipet, *Vortex type 37600 super mixer*, *Hot Plate* menggunakan *Cimarec 2* (Thermolyne), *Eppendorf / micro tubes*, Parafilm (Sigma lot. 95H0419), *Bio-rad Gel DOC XR* tipe 170 – 8170 dilengkapi komputer *software YP* dengan *Dell optiplex GX 520*, *Autoclave 55-245 (Tommy,Japan)*, *Elektroforesis Apparatus horizontal Biorad*, *Esco class II tipe A2 lab kultur (Laminary flow)*, *Inkubator CO₂ MCO – 175 (Sanyo-Japan)*. Sampel sputum yang diambil adalah sampel sputum pagi hari dari penderita, ditampung dalam copok plastik steril. Ekstraksi DNA menggunakan DNA-zol. Kondisi PCR yaitu: 1. *Hot start* 94 °C 5 menit, *Denaturasi* 94 °C 40 detik, *Annealing* 64 °C 40 detik , *Elongasi / Ekstensi* 72 °C selama 1 menit, kondisi ini dilakukan sebanyak 40 siklus dan *Elongasi post PCR* 72 °C 10 menit. Produk PCR (hasil amplifikasi) di analisis menggunakan elektroforesis gel agarose 2% menggunakan penyelarator *ethidium bromida* dan

dibaca dibawah sinar ultra violet. Susunan primer yang dignakan untuk diagnostik TB dan penentuan adanya resistensi OAT Rifampisin berdasarkan

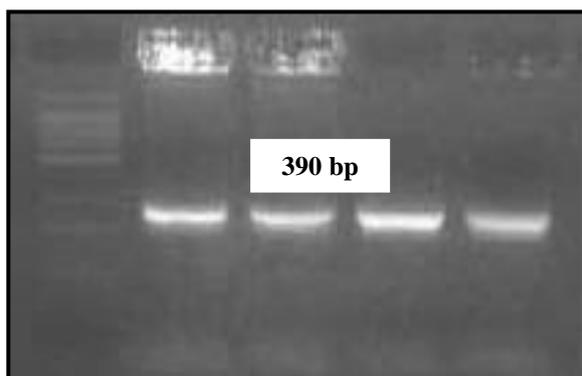
adanya mutasi gen *rpoB* menggunakan teknik PCR yaitu :

No.	Nama Primer Dan Susunan Basa Oligonukleutida	Panjang Produk (bp)	Referensi
1.	Tb1 5' – TACTACGACCACATCAACCG – 3'	390	Young (1994)
	Tb2 5' – GGGCTGTGCCCGGATCAGCG – 3'		Wada et al (2004)
2.	rpoB1R 5'- ACAGCCGCAGACGTTGATCA- 3'	363	
	rpoB1F 5'- CTAGTGATGGCGGTCAGGTAC- 3'		
3.	rpoB2R 5'-GGGAGCGGATGACCACCCA - 3'	534	
	rpoB2F 5'-TGTAGTCCACCTCAGACGAG - 3'		

PCR diagnostik dilakukan untuk mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* yang ada pada sputum menggunakan pasangan primer untuk diagnostik yaitu primer Tb 1 dan Tb 2.

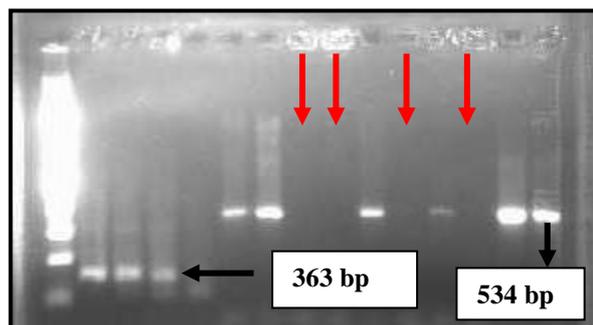
HASIL

Hasil PCR diagnostik dengan menggunakan pasangan primer Tb1 dan Tb 2 untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dari 50 sampel dengan hasil mikroskopis BTA positif, seluruhnya menunjukkan hasil PCR positif (+). Hasil PCR diagnostik tersebut terlihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil PCR diagnostik *Mycobacterium tuberculosis*

Hasil *Nested amplification* PCR pada 50 sampel yang positif pada PCR diagnostik *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan primer gen *rpoB1* dan primer gen *rpoB2* adalah 11 sampel dari 50 sampel (22%) menunjukkan hasil PCR (+) ; (-) ; (-). Sebanyak 2 sampel dari 50 sampel (4%) menunjukkan hasil PCR (+) ; (+) ; (-). Sebanyak 10 sampel dari 50 sampel (20%) menunjukkan hasil PCR (+) ; (-) ; (+). Sebanyak 27 sampel (54%) menunjukkan hasil diagnostik PCR (+); (+); (+). Dari total jumlah sampel 50 jumlah sampel, jumlah yang tidak mutasi pada gen *rpoB* yaitu 37 sampel (74 %), sedangkan jumlah yang mutasi pada gen *rpoB* yaitu 13 sampel (26 %). Hasil *nested PCR* menggunakan 2 pasang primer yaitu primer gen *rpoB1* dan primer gen *rpoB2* terlihat pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil nested PCR

Adanya band atau pita (+) pada gambar 2 menunjukkan terdeteksinya gen *rpoB* dari *Mycobacterium tuberculosis* baik pada PCR dengan pasangan primer *rpoB1* (363bp) dan nested PCR dengan menggunakan pasangan primer *rpoB2* (534 bp), artinya gen *rpoB* tidak mengalami mutasi, sedangkan tidak terbentuknya band atau pita (-) seperti pada well yang ditunjukkan panah merah menunjukkan sampel yang tidak terdeteksinya gen *rpoB* atau yang mengalami mutasi.

PEMBAHASAN

Penelitian analisis molekuler resistensi primer sputum penderita TB Paru BTA (+) dengan target gen *rpoB* dilakukan dengan tehnik molekuler *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu suatu metode untuk amplifikasi sekuens gen target secara eksponensial invitro. Tehnik PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Nested amplification* yaitu menggunakan *nested sets primer*. Pada putaran pertama amplifikasi digunakan sepasang primer (primer Tb1 dan Tb2) dan amplifikasi dilakukan sebanyak 15-30 siklus. Produk dari amplifikasi pertama (390 bp) digunakan untuk PCR kedua dengan menggunakan dua pasang primer yang spesifik terhadap *Internal sequence* (primer gen

rpoB1R dan gen *rpoB1F* serta primer gen *rpoB2R* dan gen *rpoB2F*) dengan jumlah siklus yang sama dengan amplifikasi putaran pertama. Produk PCR dideteksi dengan menggunakan elektroforesis gel. Keuntungan *nested amplification* ini yaitu dapat memberikan sensitivitas yang sangat tinggi (Djuminar A, 2005; Putra ST, 1999).

Hasil penelitian analisis molekuler resistensi primer sputum penderita TB Paru BTA (+) dengan target gen *RpoB*, dari 50 sampel yang diperiksa dengan tehnik PCR menggunakan primer Tb1 dan Tb2, seluruhnya (100%) menunjukkan hasil positif tuberkulosis. Kemudian setelah dilanjutkan dengan tehnik *nested amplification* dengan menggunakan pasangan primer gen *rpoB1R* dan *rpoB1F* menunjukkan hasil: sebanyak 27 sampel (54%) tetap positif dan 23 sampel (46%) hasilnya menjadi negatif. Hasil *nested amplification* dengan pasangan primer gen *rpoB2R* dan gen *rpoB2F* yaitu sebanyak 37 sampel (74%) tetap positif dan 13 sampel (26%) hasilnya menjadi negatif. Jika hasil pemeriksaan dengan tehnik PCR ini diinterpretasikan dengan patokan bahwa: kalau hasil PCR-nya (+), (+), (+) (primer Tb1 dan Tb2, primer *rpoB1R* dan *rpoB1F*, primer *rpoB2R* dan *rpoB2F*) atau (+), (-), (+) menandakan tidak terjadi mutasi pada gen *rpoB* dan hasil PCR-nya (+), (-), (-) atau (+), (+), (-) menandakan terjadi mutasi pada gen *rpoB*; maka dapat kita lihat bahwa: sebanyak 13 sampel (26%) terjadi mutasi pada gen *rpoB* serta bersifat resisten terhadap antibiotika rifampisin dan 37 sampel (74%) tidak terjadi mutasi pada gen *rpoB* serta bersifat sensitif terhadap antibiotika rifampisin.

Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa penelitian resistensi di Indonesia, antara lain penelitian Aditama,dkk,1995 melaporkan bahwa resistensi primer terhadap rifampisin 0,50% (Aditama,dkk,1995). Paul B, 1999 melaporkan terdapat resistensi primer terhadap rifampisin sebesar 3,5% pada tahun 1961 sampai dengan 1968, 6,9% pada tahun 1975 sampai dengan tahun 1982 dan 9,0% pada tahun 1982 sampai dengan 1986 (Paul B,1999). Pada simposium resistensi antimikroba di Indonsia, Ida Parwati,dkk dalam Stella L ahun 2008 menunjukkan bahwa di Jawa Barat dari kasus tuberculosis baru (n=644) , 43 pasien (6,7%) resisten rifampisin (Stella L,2008). Laporan penelitian Salim ST dkk., tahun 2010 di RSUP NTB, dari 17 sampel cairan pleura dari pasien TB paru (+) sebanyak 13 sampel (76,47%) menandakan tidak terjadi mutasi pada gen *rpoB* (sensitif) dan sebanyak 4 sampel (23,53%) menandakan terjadi mutasi pada gen *rpoB* (resisten) (Salim ST dkk,2010).

Perkembangan resistensi primer pada beberapa daerah menunjukkan adanya perbedaan epidemiologis. Misalnya penelitian di Rumah Sakit di California Selatan dari tahun 1969 hingga 1984 angka resistensi primer adalah sebesar 23%. Di new York dengan angka resistensi primer 13%, di Yunani pada tahun 1995 resistensi primer sebesar 1,8% dan di Indonesia tahun 1995 resistensi primer terhadap rifampisin 0,50%, (Paul B,1999).

Gambaran hasil diagnostik dengan tehnik PCR tersebut menunjukkan bahwa bakteri dapat menjadi resisten terhadap antibiotik yang sebelumnya efektif. Kemampuan bakteri tersebut untuk terus menerus mengembangkan resistensi

terhadaap agen antibakteri menyebabkan perlunya dikembangkan obat-obat baru. Timbulnya resistensi suatu bakteri terhadap agen antibakteri dalam suatu populasi besar sel bakteri yang terpapar antibakteri cukup sederhana. Bila dalam suatu populasi besar sel, ada beberapa sel yang secara genotip resisten (mempunyai sifat resisten terhadap obat), sel yang dapat tumbuh dalam lingkungan abiotik 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 enzimatik antibiotik, (3) modifikasi sifat tempat reseptor obat, (4) peningkatan sintesis metabolit antagonis terhadap antibiotik (Shulman ST dkk., 1994).

Resistensi terhadap obat anti tuberculosis (OAT) ada 3 macam yaitu (1) mutan yang resisten, di dalam setiap populasi bakteri tuberculosis (TB) akan ada bakteri dalam jumlah kecil yang resisten secara alami. Apabila hanya satu jenis obat yang diberikan, bakteri TB yang sensitif 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 ketularan oleh orang yang memiliki bakteri TB dengan resistensi

yang diperoleh terhadap satu obat atau lebih (Crofton J dkk., 2002).

Pada penelitian analisis molekuler resistensi primer sputum penderita TB Paru BTA (+) dengan target gen *rpoB* menunjukkan hasil yang resisten sebesar 26% bisa disebabkan karena terjadinya modifikasi sifat pada tempat reseptor obat/modifikasi pada daerah sasaran obat (mutasi), dimana mutan resistensi-rifampisin mempunyai polimerase RNA dengan subunit B yang telah berubah dan gagal mengikat rifampisin. Hasil negatif (terjadi mutasi pada gen *rpoB*/resisten) bisa juga disebabkan karena akibat *nucleotide mismatch* (ketidakcocokan nukleotida karena mutasi) dimana hasil PCR TB menggunakan primer Tb1 dan Tb2 hasilnya positif seharusnya hasil PCR dengan menggunakan primer *rpoB* juga positif.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Pemeriksaan Mikroskopis BTA dari 50 sampel sputum seluruhnya BTA positif (100%). PCR diagnostik dengan primer gen Tb1 dan gen Tb2, seluruh sampel (50 sampel) hasilnya positif (+) tuberkulosis. PCR diagnostik dengan teknik *nested amplification* dengan primer gen *rpoB1* hasil negatif sebanyak 23 sampel (46%), dengan primer gen *rpoB2* hasil negatif sebanyak 13 sampel (26%). Sebanyak 13 sampel (26%) terjadi mutasi pada gen *rpoB*/bersifat resisten terhadap antibiotika rifampisin.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menentukan lokasi mutasi pada satu basa, dengan

menggunakan metode sequencing DNA atau HDF (*Heteroduplex Formation*). Sangat perlu dilakukan pelaporan bentuk apapun yang didapat 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* di Kabupaten lain di daerah NTB.

DAFTAR PUSTAKA

- Arlina G. 2003. Kecepatan Tuberculosis Paru Pada Pasangan Suami – Isteri Penderita Tuberculosis Paru Yang Berobat Di Bagian Paru RSUD.H. Adam Malik. USU Sumatera Utara.
- Badan Litbang Kesehatan, Departemen Kesehatan RI. 2010. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2010. Jakarta.
- Brooks GF; Butel JS; Morse SA. 2005, Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) buku 1, Salemba Medika, Jakarta
- Crofton SJ; Horne N; Miller F. 2002, Tuberculosis Klinis, Widya Medika, Jakarta
- Depkes R.I. 2007. Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberculosis. Edisi 2 Cetakan Pertama. Jakarta.
- Djuminar A. 2005, Biologi Molekuler, Jurusan Analisis Kesehatan, Bandung
- Dikes Lotim. 2010. Profil Bidang P2PL Tahun 2010.
- Hilaluddin. 2008. Multi-Drug Resistensi (MDR) Pada Penderita tuberculosis Paru Dengan Diabetes Melitus, Laporan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Paru.
- Paul Boekitwetan. 1999. Resistensi Multiple Obat Antituberculosis. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. Jakarta.

- Putra S T. 1999. Biologi Molekuler Kedokteran, Surabaya, Airlangga University Press
- Salim S.T, Haris W, Zainul M. 2010. Penelitian Pola Kepekan Bakteri *Mycobacterium Tuberculosis* Terhadap Obat Anti – TB Menggunakan Teknik PCR. Jurnal Kedokteran Mataram, Nomor 6 Juni 2010.
- Soedarsono. 2010. Tuberkulosis Multidrug-resistant: Deteksi dan Penatalaksananya. Workshop dan seminar penatalaksanaan terkini berbagai penyakit metabolik, kardiovaskuler dan paru. Mataram.
- Stella I. 2008. Tinjauan Kepustakaan tuberculosis Paru. FK UI. Jakarta.
- Sugiyono. 2005 “ Statistika dan Penelitian, Penerbit Alfabeta Bandung.
- Shulman ST: Phair JP : Sommers HM. 1994. Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi. Edisi IV. Gajah Mada University Press.
- WHO. 2008. Global Tuberculosis Control. Geneva.