

## Karakteristik Morfologi *Mycobacterium tuberculosis* yang Terpapar Obat Anti TB Isoniazid (INH)

Widodo<sup>1</sup>, Agus Irianto<sup>2</sup> dan Hendro Pramono<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Poltekkes Kemenkes Semarang

<sup>2</sup> Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Email : widodo124@ymail.com

### Abstract

INH's role in inhibiting the synthesis of mycolic acid which is a component of the cell wall of *M. tuberculosis*. The experiment research method using a complete randomized experimental design with variations in exposure time 24 hours, 48 hours, 72 hours and 96 hours on INH concentration of 0.5 µg/ml with 6 replications. The results showed influence on each 0.5 µg/ml INH treatment towards the characteristics of *M. tuberculosis*, at 24 hours of exposure was obtained 18.25% percentage growth, the average cell size was 1.64 x 0.35 µm, the percentage of cell damage was 28.1%. At 48 hours of exposure was obtained 7.9% percentage of cell growth, the average cell size was 1.64 x 0.36 µm, the percentage of cell damage was 41%. At 72 hours of exposure was obtained 7.0% percentage of cell growth, the average cell size was 1.64 x 0.32 µm, the percentage of cell damage was 53.4%. At 96 hours of exposure was obtained 1.6% percentage of cell growth, the average cell size was 1.61 x 0.29 µm, the percentage of cell damage was 57%. Morphological changes in cells exposed to 0.5 µg/ml INH were wrinkles on the cell surface and length shrinkage occur after the regeneration of cells, the cells surface began to become rough and has little damage, the cells experience lysis and the half part of it was oval, the cell's shape changes into cocci. The characteristics of *M. tuberculosis* exposed to INH 0.5 µg/ml were changes in cell morphology, shorter and change form rods into cocci. However, the morphological changes did not endure permanently in the next generation.

**Keywords** : *M. tuberculosis*, INH, phenotype.

### Abstrak

INH mempunyai peranan dalam menghambat sintesis asam mikolat yang merupakan komponen pembentuk dinding sel *M. tuberculosis*. Metode penelitian eksperimen dengan menggunakan Rancangan percobaan acak Lengkap dengan variasi waktu pemaparan 24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam pada konsentrasi INH 0,5 µg/ml dengan jumlah ulangan 6. Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh pada masing-masing perlakuan INH 0,5 µg/ml terhadap karakteristik *M. tuberculosis*, pada pemaparan 24 jam diperoleh persentase pertumbuhan 18,25%, ukuran rerata sel 1,64 x 0,35 µm, persentase kerusakan sel 28,1%. Pada pemaparan 48 jam diperoleh persentase pertumbuhan sel 7,9%, ukuran rerata sel 1,64 x 0,36 µm, persentase kerusakan sel 41%, pada pemaparan 72 jam diperoleh persentase pertumbuhan sel 7,0%, ukuran rerata sel 1,64 x 0,32 µm, persentase kerusakan sel 53,4%, pada pemaparan 96 jam diperoleh persentase pertumbuhan sel 1,6%, ukuran rerata sel 1,61 x 0,29 µm, persentase kerusakan sel 57%. Perubahan morfologi sel yang terpapar INH 0,5 µg/ml pada permukaan sel terjadi kerutan dan penyusutan panjang sel setelah regenerasi, permukaan sel mulai kasar dan sedikit ada kerusakan, sel mengalami lisis dan sebagian sel berbentuk oval, sel mengalami perubahan bentuk menjadi kokus. karakteristik *M. tuberculosis* yang terpapar INH 0,5 µg/ml mengalami perubahan morfologi sel, menjadi lebih pendek dan perubahan bentuk dari batang menjadi kokus, namun perubahan morfologi ini tidak terjadi secara permanen pada generasi berikutnya.

**Kata kunci** : *M. tuberculosis*, INH, Morfologi.

### Pendahuluan

Perkembangan resistensi INH adalah awal munculnya Multi Drug Resistant (MDR) sebagai hasil akuisisi dari mutasi gen untuk target obat yang berbeda, diperberat dengan kasus Human Immunodeficiency Virus HIV dan ketidakpatuhan pasien dalam pengobatan (Rattan *et al.*, 1998). INH adalah obat yang memerlukan aktivasi oleh katalase atau enzim KatG peroksidase yang dikodekan oleh gen *katG*, INH menghambat sintesis asam mikolat melalui NADH-protein, reduktase enoil asil dikodekan oleh *Inha* (Rawat *et al.*, 2003). INH sangat aktif terhadap kompleks MTB (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* dan *M. microti*) dengan konsentrasi hambatan minimal

0,02-0,06 mg/ml (Youatt, 1969; Rattan *et al.*, 1998).

Resistensi pada *M. tuberculosis* terjadi secara spontan untuk INH dengan frekuensi 1 dari 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> basil per generasi (Zhang *et al.*, 2009). Resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat disebabkan karena adanya mutasi gen selain itu karena pengaruh seleksi strain yang resisten selama proses terapi (Kochi *et al.*, 1993). *M. tuberculosis* resisten secara alami terhadap antibiotik dikaitkan dengan struktur dari dinding sel yang mengandung mikolat sehingga permeabilitas rendah terhadap beragam antibiotik. Hal ini karena porin pada *M. tuberculosis* tidak mudah dilalui zat terlarut dalam konsentrasi

rendah dan in aktivasi enzim terhadap obat (Jarlier dan Nikaido, 1994).

Pada penelitian Takayama *et al.* (1973) dengan menggunakan sampel *M. tuberculosis* yang dipaparkan dengan INH 0,5 µg/ml tidak menunjukkan terjadinya perubahan morfologi pada pemaparan selama 3 jam, perubahan morfologi terjadi setelah 24 jam pada dinding sel yang diamati dengan mikroskop elektron. Dinding sel bakteri dapat mengalami perubahan struktural dinamis selama terpapar obat, sehingga mengurangi sifat resisten terhadap asam yang dapat berfungsi sebagai strategi adaptif untuk bertahan hidup pada inang (Kochi *et al.*, 1993). Pada pengamatan strain mutan, menunjukkan terjadinya penumpukan asam mikolat lebih tinggi di dinding sel bila dibandingkan dengan tipe liar (Lee *et al.*, 1999)

Penelitian ini dilakukan untuk melakukan evaluasi karakteristik *M. tuberculosis* yang terpapar oleh INH dilihat dari morfologi dinding sel, pengecatan Ziehl Neelsen, dan jumlah koloni yang tumbuh untuk mengetahui dampak dari INH terhadap terjadinya perubahan karakteristik secara fenotip.

## Materi dan Metode

Penelitian dilaksanakan Laboratorium Kesehatan Propinsi Jawa Tengah, Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan Universitas Jenderal Soedirman dan Laboratorium *International Tropical Marine and Earth Sciences Laboratory* (ITMEL) Universitas Jenderal Soedirman.

Sampel diperoleh dari BKPM Semarang dengan kriteria sampel sputum penderita TB belum mengalami pengobatan, diperoleh hasil mikroskopis BTA dengan hasil minimal +1, dilakukan kultur pada LJ, dilakukan DST, identifikasi *M.tuberculosis*

Jenis penelitian eksperimental dengan variasi waktu pemaparan INH yaitu 24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam dengan konsentrasi INH 0,5 µg/ml dengan jumlah pengulangan 6. Variabel bebas lama paparan INH terhadap *M. tuberculosis*, sedangkan variabel terikatnya pertumbuhan koloni *M. tuberculosis*, morfologi sel dengan pengamatan mikroskopis dan SEM.

Kultur *M.tuberculosis* pada media LJ selama 5 minggu kemudian dilakukan pemaparan terhadap INH selama 24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam kemudian diisolasi pada media Lowenstein Jensen selama 5 minggu dengan suhu 37°C dilakukan pengamatan setiap minggu dicatat pertumbuhan koloni selama 5 minggu. Dilakukan uji niacin, katalase tahan panas, dilakukan pengecatan dengan menggunakan pengecatan Ziehl Neelsen, pengecatan Gram diamati dengan mikroskop multimedia Nikon 1000, processing sampel *M. tuberculosis* untuk pengamatan dengan mikroskop Elektron Hitachi 3000 X.

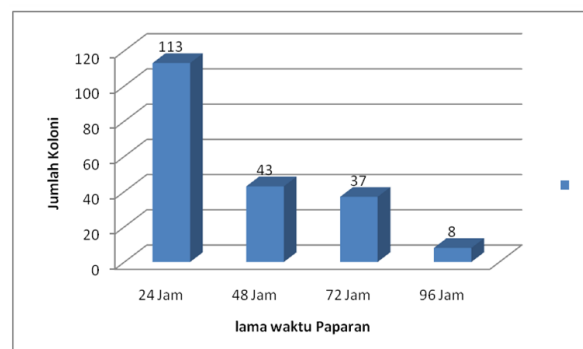
## Hasil dan Pembahasan

Sampel dahak yang diperoleh dari Balai Kesehatan Paru Masyarakat Semarang (BKPM Semarang), dilakukan uji langsung dengan melakukan pembuatan preparat sedian, kemudian dilakukan pengecatan Ziehl Neelsen (ZN), proses kultur dilakukan dengan dekontaminasi NaOH, kemudian ditanam pada media Lowenstein Jensen (LJ) selama 5 minggu, pengamatan pada setiap minggu, setelah tumbuh kemudian dilakukan uji asam P nitrobenzoat (PNB), niacin dan katalase panas untuk menentukan sub tipe bakteri. Pemeriksaan sampel A, B, C dan D dengan hasil kultur 3 +, niacin positif, katalase panas negatif, PNB hasil negatif, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk sub tipe *M. tuberculosis*, selanjutnya dilakukan uji DST INH 0,2 µg/ml, hasil yang diperoleh dari sampel A, B, C dan D semua bakteri *M. tuberculosis* sensitif terhadap INH 0,2 µg/ml.

*M. tuberculosis* diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 minggu, adapun yang belum menunjukkan pertumbuhan diinkubasi kembali sampai 8 minggu, apa bila tidak ada pertumbuhan dilaporkan sebagai hasil negatif. Pada beberapa sampel terdapat perubahan warna dari biru muda menjadi hijau tua.

### Pertumbuhan *M. tuberculosis*

Pada penelitian ini pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan melakukan inokulasi kembali pada media LJ selama 5 minggu, dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop elektron terhadap bakteri yang tumbuh pada media LJ. Pada penelitian pengamatan hasil setelah terpapar INH 0,5 µg/ml melalui inokulasi terlebih dahulu, sedangkan penelitian Takayama *et al.* (1973) pengamatan dilakukan secara langsung setelah dilakukan pemaparan dengan INH.



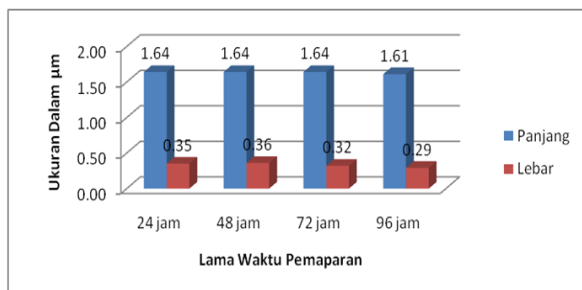
Gambar 1 Pertumbuhan *M. tuberculosis* yang terpapar INH 0,5 µg/ml

Pada pengamatan pertumbuhan koloni yang tidak terpapar INH sudah muncul koloni bakteri pada 2 minggu inkubasi, sedangkan pada

sampel yang dipaparkan dengan INH baru muncul koloni bakteri pada 3 minggu dengan suhu inkubasi 37°C suasana aerobe. Pemaparan selama 24 jam koloni bakteri tumbuh sebanyak 113 koloni, pemaparan 48 jam koloni bakteri tumbuh sebanyak 43 koloni, pemaparan selama 72 jam koloni bakteri sebanyak 37 koloni, pemaparan selama 96 jam koloni bakteri 8 koloni.

### Ukuran *M. tuberculosis*

Pertumbuhan *M. tuberculosis* bervariasi dalam ukuran dan bentuk dari coccu basil ke batang panjang, dengan ukuran sel pada strain H37 subkultur di Columbia University bervariasi dari 4,3x0,4 µm dan 1,0x0,2 µm (Velayati dan Farnia, 2012). *M. tuberculosis* menjadi lebih pendek dalam kultur yang lebih tua dan bulat telur saat kondisi kekurangan nutrisi (Shleeva *et al.*, 2011).



Gambar 2 Ukuran rerata panjang dan lebar *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan mikroskop trinokuler Nikon (Kultur 5 minggu pada media LJ)

Hasil pengukuran rerata panjang dan lebar *M. tuberculosis* pada sampel dahak dengan panjang 2,92 x 0,34 µm setelah dilakukan kultur pada media LJ (sampel TO) ukuran menjadi 1,84 x 0,38 µm ini dikarenakan pada saat pembuatan preparat inkubasi pada media LJ hanya 5 minggu kemudian dilakukan paparan dengan INH konsentrasi 0,5 µg/ml sesuai dengan perlakuan kemudian diinkubasi pada media LJ selama 5 minggu.

Diperoleh hasil pengukuran *M. tuberculosis* pada pemaparan INH selama 24 jam dengan ukuran rerata 1,64 x 0,35 µm, lama pemaparan 48 jam ukuran rerata 1,64 x 0,36 µm, lama pemaparan 72 jam rerata ukuran 1,64 x 0,32 µm, lama pemaparan 96 jam rerata ukuran 1,61 x 0,29 µm. INH mempengaruhi pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* Pemberian INH secara *in vitro* sebanyak 0,5 µg/ml akan mempengaruhi biosintesis asam mikolat lama paparan berkorelasi dengan kerusakan sel pada *M. tuberculosis* dan ukuran panjang bakteri (Takayama *et al.*, 1973).

Tabel 1: Persentase kerusakan *M. tuberculosis* terpapar INH 0,5 µg/ml

Sampel	persentase Normal %	persentase abnormal %
24 jam	71.09.00	28.01.00
48 jam	59.00.00	41.00.00
72 jam	46.06.00	53.04.00
96 jam	43.00.00	57.00.00

*M. tuberculosis* (H37Rv) sebagai kontrol negatif, He sebagai kontrol positif dan strain kultur *M. tuberculosis* yang semuanya memiliki bentuk 100 % normal, sedangkan pada pemaparan INH selama 24 jam menyebabkan 71,9 % normal dan 28,1 % abnormal, pemaparan INH selama 48 jam menyebabkan 59,0 % normal dan 41,0 % abnormal, pemaparan INH selama 72 jam menyebabkan 46,0 % normal dan 53,4 % abnormal, pemaparan INH selama 96 jam menyebabkan 43,0 % normal dan 57,0 % abnormal pengamatan dilakukan dengan mikroskop multimedia Nikon 1000 dengan kriteria sel normal berbentuk batang, ukuran normal, sedangkan kriteria sel abnormal kerusakan pada dinding sel, penyerapan warna tidak maksimal (berwarna pucat), bentuk bengkok dan menyerupai kokus.

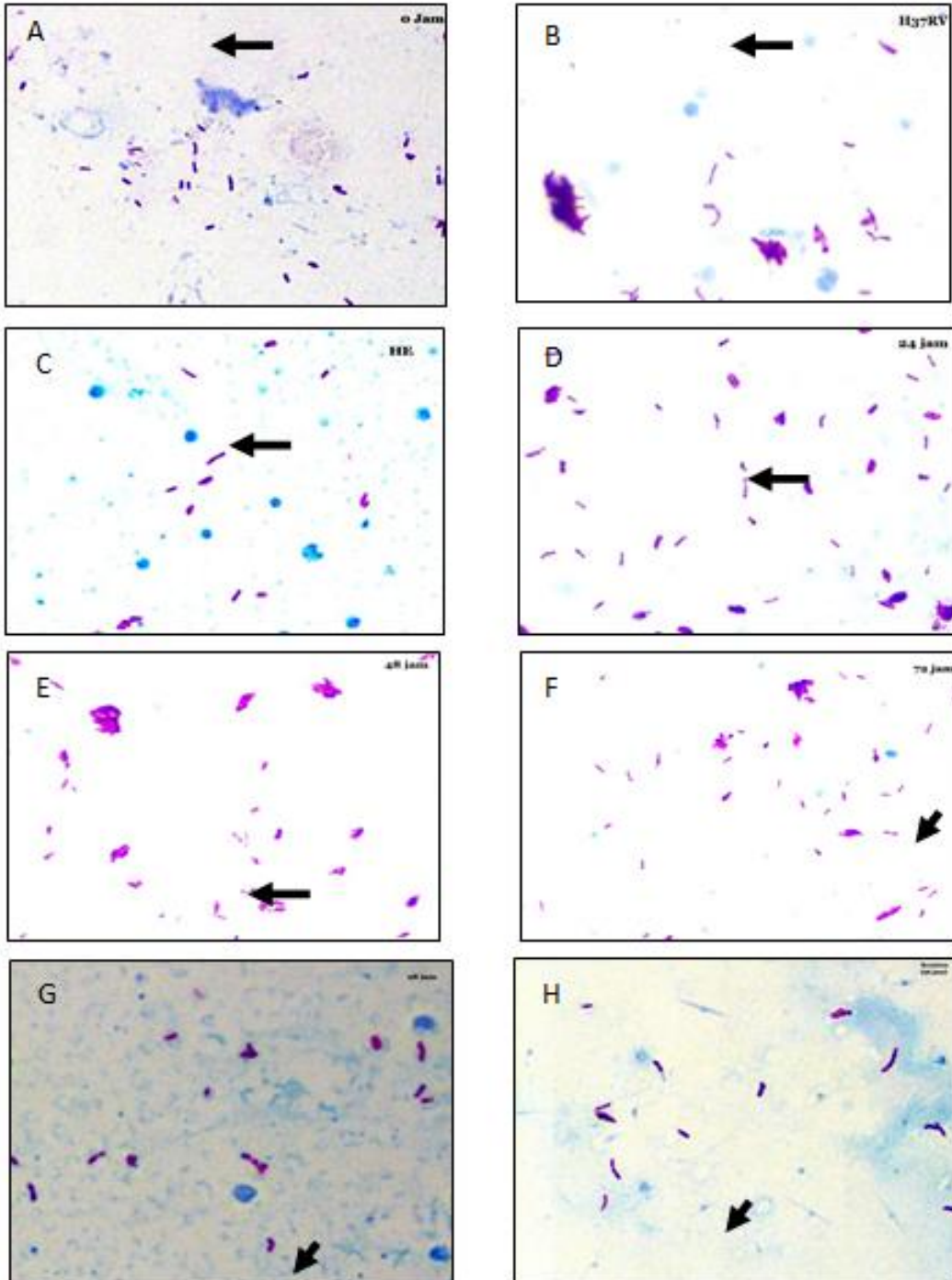
### Morfologi *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* yang diamati dengan SEM mengalami dua fitur yang berbeda, pertama sel mengalami retakan atau gerakan *post fission* gerakan yang dikarenakan dinding sel berlapis – lapis dimana lapisan dalam membentuk septum sedangkan lapisan luar pecah di satu sisi, fitur kedua terkait dengan pembelahan sel membentuk struktur percabangan sementara (Dahl, 2004).

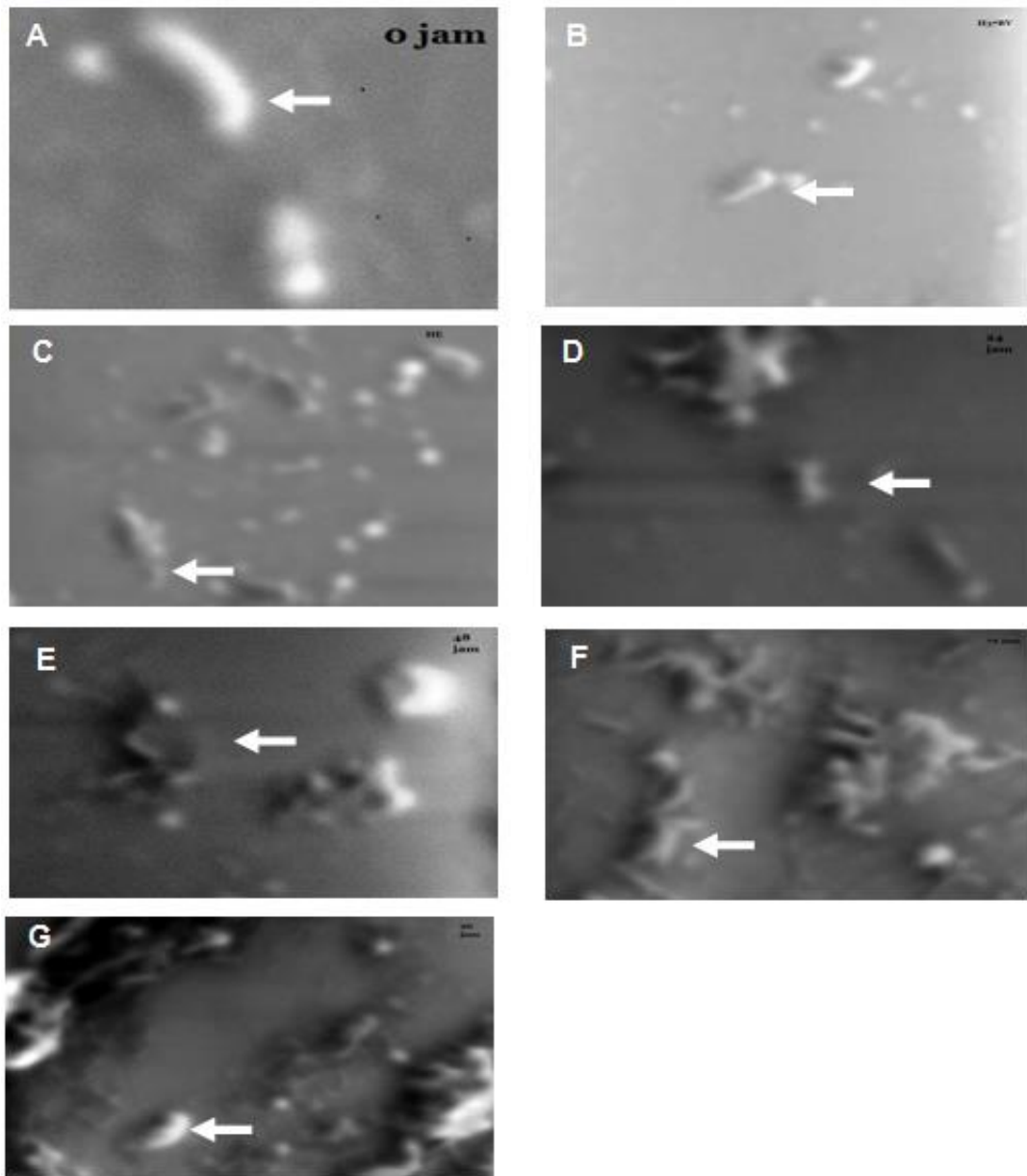
Gambar 3.A) bakteri berbentuk normal tidak ada yang mengalami kerusakan dinding sel, gambar 3.B) pada kontrol negatif H37RV yang telah disubkultur sebelumnya memiliki bentuk yang normal dengan membentuk diplo basil dan bergerombol, gambar 3.C) pada kontrol positif HE bentuk normal seragam dengan persebaran merata tidak banyak yang membentuk fragmen, gambar 3.D) pada paparan 24 jam bentuk morfologi mulai ada perubahan salah satunya perubahan ukuran, adanya kerutan pada sel, gambar 3.E) paparan 48 jam banyak dijumpai sel yang rusak pada permukaan dinding sel, adanya sel yang pucat akibat tidak mampu mempertahankan warna merah saat de colorisasi dengan asam, gambar 3.F) pada paparan 72 jam banyak sel yang pucat dan terdapat sel dengan

bentuk oval, gambar 3.G) pada paparan 96 jam *M.tuberculosis* berbentuk kokus dengan sifat resisten terhadap INH, gambar 3.H) generasi ke dua dari paparan 96 jam perubahan morfologi

yang awalnya banyak dijumpai bentuk kokus dan mulai beragam bentuk sel dengan mempertahankan warna merah lebih kuat.



Gambar 3. Morfologi *M. tuberculosis* pengecatan Ziehl Neelsen , (pengamatan perbesaran 1000 X mikroskop trinokuler a) Tanpa terpapar obat, b) sebagai kontrol Strain *M. tuberculosis* (H37Rv) , c) Kontrol Resistensi INH dan Entabuntol (HE), d) terpapar INH 24 jam, e) terpapar INH 48 jam, f) terpapar INH 72 jam, g) terpapar INH 96 jam, h) Resistensi dari proses pemaparan.



Gambar 4. Morfologi *M. tuberculosis* (scanning microscope elektron perbesaran 10.000 X) A. tanpa ada perlakuan, B. Kontrol negatif merupakan *M. tuberculosis* Strain H37Rv tanpa ada perlakuan Obat INH , C. Kontrol positif merupakan *M. tuberculosis* yang telah terhadap resistensi INH dan Entambutol (HE), pemaparan Isoniazid 0,5  $\mu\text{g/ml}$  pada D. Terpapar 24 jam , E terpapar 48 jam, F. Terpapar 72 jam, G. Terpapar 96 jam

Gambar 4. A) menunjukkan sel yang belum mengalami paparan INH dengan bentuk batang, gambar 4.B) menunjukkan kontrol negatif dari H37RV dengan bentuk sel normal tidak ada kerusakan pada permukaan sel, gambar 4.C) kontrol Positif HE dengan hasil pengamatan bentuk sel normal banyak dijumpai sel dengan ukuran kecil. Gambar 4.D) waktu paparan INH selama 24 jam terlihat adanya sedikit kerutan pada dinding sel yang diperlihatkan dengan anak panah warna merah, gambar 4.E) waktu paparan 48 jam dijumpai sel dengan bentuk bulat dan menggerombol bentuk sel tak beraturan, gambar

4.F) waktu paparan 72 jam ditemukan sel dengan bentuk ujung bercabang seperti huruf Y, bentuk sel beragam didominasi bentuk batang, gambar 4.G) waktu paparan 96 jam dijumpai sel pada bagian ujung membentuk bulat dan sel dengan bentuk bulat mendominasi. Hasil pengamatan bentuk sel beragam ada yang mengalami percabangan pada bagian ujung sel, ada yang mengalami pematihan pada salah satu sisi sel, bentuk sel ada yang membengkok ke kanan maupun ke kiri, banyak dijumpai ukuran dibawah normal. Pada paparan selama 96 jam persentase kerusakan mencapai 57 % dengan dominasi



bentuk sel yang menyerupai kokus berantai, kerusakan dapat terlihat jelas pada pengamatan SEM dengan adanya patahan pada bagian sel, dijumpai serpihan sel yang mengalami lisis, pada pengecatan ZN terdapat perubahan bentuk sel ke arah kokus tiap sel terdiri dari 2 sampai 3 sel.

lama paparan terhadap bentuk dinding sel *M. tuberculosis* setelah 24 jam dipaparkan menunjukkan gambaran morfologi mulai beragam dengan urutan perubahan morfologi sebagai berikut : 1. Terjadi kerutan pada permukaan sel penyusutan panjang setelah regenerasi, 2. Permukaan sel mulai kasar dan sedikit ada kerusakan, 3. Sitoplasma mulai dikeluarkan dari sel, 4. Sel mengalami perubahan bentuk dari batang menjadi kokus.

Selubung pada *M. tuberculosis* memiliki tiga komponen penyusun yaitu struktur plasma membran, dinding dan kapsul. Pelasma membran memainkan peran dalam proses patologis, dinding menyerupai dinding gram positif tetapi memiliki lapisan lipid ester mikolat yang semua komponennya mempunyai peran penting dalam fisiologi dan patogenesitas (Daffe dan Draper, 1997).

Hilangnya L,D transpeptidase 1 dan 2 dari *M. tuberculosis* (LdtMt dan LdtMt2 ) mampu merubah morfologi permukaan sel, bentuk, ukuran, matrik seluler, pengaturan beberapa protein dengan berat molekul rendah yang ditujukan ke membran atau keluar sel, mempengaruhi pertumbuhan, virulensi dan ketahanan *M. tuberculosis* untuk amoxicillin clavulanate dan vancomycin (Schoonmaker *et al.*, 2014).

Mekanisme penetrasi molekul kecil kedalam sel *M. tuberculosis* melalui selubung sel yang terdiri membran plasma, dinding dan kapsul secara struktural berbeda dari Gram positif dan Gram negatif, seluruh selubung sel mycobacteria dapat dipecah menjadi dua komponen utama yaitu struktur membran sel dan dinding sel. Dinding sel terdiri dari asam mikolat yang kovalen dengan kompleks arabinogalactan, peptidoglikan. Mycobacteria mampu menghasilkan banyak asam mikolat dengan berbagai ukuran panjang dan modifikasi tergantung spesies dan kondisi pertumbuhan (Daffe dan Draper, 1997 ; Barry *et al.*, 2007).

Penggunaan fuksin pada pewarnaan *M. tuberculosis* dengan konsentrasi 0,3 % akan mengurangi sensitivitas, tetapi penggunaan fuksin diatas 0,3 % memiliki sensitivitas yang sama hanya menggunakan reagen yang lebih banyak (Selvakumar *et al.*, 2005). Morfologi di *M. tuberculosis* diklasifikasikan ke dalam dua kategori sel – sel tersebut sering terlihat pada fase eksponensial pertumbuhan yang batang, V, Y atau bercabang dan bila dalam kondisi stress atau lingkungan yang kurang menguntungkan

berbentuk bulat, oval, atau bengkok menyerupai huruf L (Velayati dan Farnia, 2012 ; Dahl, 2004).

*M. tuberculosis* selama pembentukan septum membran plasma dan dinding sel bagian dalam tumbuh ke dalam lapisan dinding sel luar tetap utuh. Setelah menyelesaikan pembentukan septum lapisan dalam mungkin terus tumbuh memberikan tekanan pada lapisan luar dinding sel, selanjutnya akan terbentuk 2 sel anak (Dahl, 2004 ; Malhotra *et al.*, 2010). Cabang pertama kali terlihat sebagai tunas kecil setelah tumbuh akan melepaskan diri sebagai sel terpisah. pada penelitian ini paparan selama 96 jam 57 % sel berbentuk bulat, oval dikarenakan pengaruh adaptasi terhadap INH 0,5 µg/ml kondisi ini akan kembali seperti semula bila faktor yang mempengaruhi telah dihilangkan.

## Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian karakteristik *M. tuberculosis* yang terpapar INH 0,5 µg/ml diperoleh kesimpulan : (1). Terjadi penurunan jumlah sel dan pertumbuhan koloni sel yang tanpa paparan INH muncul pada 2 minggu inkubasi, sedangkan pada sel yang terpapar INH muncul koloni pada 3 minggu inkubasi pada suhu 37°C suasana aerobe, dan (2). Terjadi kerutan pada permukaan sel, penyusutan panjang sel setelah regenerasi, Permukaan sel mulai kasar dan sedikit ada kerusakan, sitoplasma mulai dikeluarkan dari sel, sel mengalami perubahan bentuk dari batang menjadi kokus.

## Daftar Referensi

- Dahl, J. L. 2004. Electron microscopy analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cell division. *FEMS Microbiology Letters*. 240 (1) : 15-20.
- Jarlier, V., and Nikaido, H. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*. 123(1-2), 11-18.
- Kochi, A., Vareldzis, B., and Styblo, K. 1993. Multidrug-resisten tuberculosis and its control. *Research in Microbiology*. 144(2): 104-110.
- Larrouy-Maumus, G., Marino, L. B., Madduri, A. V., Ragan, T. J., Hunt, D. M., Bassano, L., Gutierrez, M.G., Moody, D.B., Pavan, F. R., and de Carvalho, L. P. S. 2016. Cell-Envelope Remodeling as a Determinant of Phenotypic Antibacterial Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infectious Diseases*. 2(5): 352-360.
- Lee, A. S., Lim, I. H., Tang, L. L., Telenti, A., and Wong, S. Y. 1999. Contribution of kasA Analysis to Detection of isoniazid-Resisten

- Mycobacterium tuberculosis in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(8): 2087-2089.
- Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., and Biswal, S. 2010. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Research*. 38(17): 5718-5734.
- Ramaswamy, S. V., Reich, R., Dou, S. J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T., and Graviss, A. 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 : 1241-1250.
- Rattan, A., Kalia, A., and Ahmad, N. 1998. Multidrug - resistent Mycobacterium tuberculosis : molecular perspectives *Emerging Infectious Diseases*. 4(2) : 195 – 209.
- Rawat, R., Whitty, A., and Tonge, P. J. 2003. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(24): 13881-13886.
- Schoonmaker, M. K., Bishai, W. R., and Lamichhane, G. 2014. Nonclassical transpeptidases of Mycobacterium tuberculosis alter cell size, morphology, the cytosolic matrix, protein localization, virulence, and resistance to  $\beta$ -lactams. *Journal of Bacteriology*. 196(7): 1394-1402.
- Selvakumar, N., Gomathi Sekar, M., Rahman, F., Syamsunder, A., Durairandian, M., Wares, F., and Narayanan, P. R. 2005. Comparison of variants of carbol-fuchsin solution in Ziehl-Neelsen for detection of acid-fast bacilli [Technical Note]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 9(2): 226-229.
- Shleeva, M.O., Kudykina, Y.K., Vostroknutova, G.N., Suzina, N. E., Mulyukin, A. L., and Kaprelyants, A. S. 2011. Dormant ovoid cells of Mycobacterium tuberculosis are formed in response to gradual external acidification. *Tuberculosis*. 91 (2): 146 – 154.
- Takayama, K., Wang, L., and David, H. L. 1973. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2(1): 29-35.
- Thanky, N. R., Young, D. B., and Robertson, B. D. 2007. Unusual features of the cell cycle in mycobacteria: polar-restricted growth and the snapping-model of cell division. *Tuberculosis*. 87(3): 231-236.
- Velayati, A.A., and Farnia, P. 2012. Morphological Characterization of mycobacterium tuberculosis. INTECH Open Access Publisher. <http://www.interchopen.com/books/understanding-tuberculosis> diakses 10 Agustus 2016.
- Youatt, J. 1969. A Review of the Action of isoniazid 1. *American Review of Respiratory Disease*. 99(5): 729-749.
- Zhang, Y., Garbe, T., and Young, D. 1993. Transformation with Kat G restores isoniazid-sensitivity in Mycobacterium tuberculosis isolates resistent to a range of drug concentrations. *Molecular Microbiology*. 8(3): 521-524.
- Zhang, Y., and Yew, W. W. 2009. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [State of the art series. Drug-resistent tuberculosis. Edited by CY. Chiang. Number 1 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 13(11): 1320-1330