

DESAIN PRIMER DAN ANALISIS SECARA *IN SILICO* UNTUK
AMPLIFIKASI GEN *embB Mycobacterium tuberculosis*

T. V. Putri¹, S. C. Yowani^{1*}, dan I G. A. A. Septiari²

¹Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

²Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

*Email: cyowani@unud.ac.id

Article Received on: 13th January 2026

Revised on: 23rd January 2026

Accepted on: 30th January 2026

ABSTRAK

Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini pertama terdiri dari kombinasi Isoniazid, Rifampisin, Pirazinamid, dan Ethambutol. Meskipun terapi ini efektif, resistensi terhadap obat, termasuk Ethambutol, menjadi tantangan serius dalam pengendalian TB. Oleh karena itu, dibutuhkan deteksi cepat terhadap resistensi Ethambutol untuk regimen pengobatan yang tepat dan mencegah penyebaran tuberkulosis yang resisten dengan cara yang efisien. Resistensi terhadap Ethambutol dengan frekuensi resistensi tinggi, umumnya disebabkan oleh mutasi gen *embB*. Mutasi yang dianalisis mencakup M306V (perubahan kodon ATG menjadi GTG) dan Q497R (perubahan kodon CAG menjadi CGG), yang telah dilaporkan sebagai *hotspot* mutasi pada gen *embB M. tuberculosis* resisten ethambutol. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh sepasang primer terbaik hasil desain secara *in silico* menggunakan program *Clone Manager suite 12* untuk metode *Real-Time PCR*. Primer dirancang secara *in silico* dengan menggunakan program *Clone Manager Suite 12*. Primer terpilih, dilakukan uji spesifisitas dan tingkat kesamaan sekuens pada *database* NCBI menggunakan Primer-BLAST. Sekuen DNA yang digunakan dalam analisis primer diunduh dari situs www.ncbi.nlm.nih.gov dengan *accession number*: MK579314.1 yang merupakan sekuens DNA gen *embB M. tuberculosis* H37Rv. Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah pasangan primer *forward* gen *embB* dengan urutan sekuens 5'-ATTGCCAGCTCCTCCTCAG-3' (20 nukleotida) dan primer *reverse* dengan urutan sekuens 5'-CGCCGCAACATGATGAACAC-3' (20 nukleotida). Primer yang dihasilkan telah memenuhi kriteria pasangan primer yang baik dilihat dari panjang primer, nilai T_m, %GC, stabilitas, jumlah *hairpins*, *repeats*, *dimers*, dan *runs*. Serta, hasil uji spesifitas yang menunjukkan pasangan primer spesifik mengenali hanya bakteri *M. tuberculosis*.

Kata kunci: Desain primer, gen *embB*, *in silico*, *M. tuberculosis*, Resistensi Ethambutol.

ABSTRACT

First-line anti-tuberculosis drugs (OTD) consist of a combination of Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamide, and Ethambutol. Although this regimen is effective, drug resistance, including resistance to Ethambutol, poses a significant challenge in tuberculosis control. Rapid detection of Ethambutol resistance is crucial for determining appropriate treatment regimens and preventing the spread of resistant TB strains. High-frequency resistance to Ethambutol is generally caused by mutations in the *embB* gene, particularly at mutation hotspots M306V (ATG to GTG) and Q497R (CAG to CGG) found in Ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. This study aimed to obtain the best primer pair designed in silico using the Clone Manager Suite 12 program for use in the Real-Time PCR method. Primer design and analysis were conducted in silico, with specificity and sequence similarity assessed using Primer-BLAST against the NCBI database. The DNA template used for primer analysis was obtained from the NCBI database (accession number: MK579314.1), representing the *embB* gene sequence of *M. tuberculosis* H37Rv. The results identified an optimal primer pair: forward primer 5'-ATTGCCAGCTCCTCCTCAG-3' and reverse primer 5'-CGCCGCAACATGATGAACAC-3'. These primers met the criteria for ideal primer design in terms of length, melting temperature (T_m), GC content, stability, and minimal formation of hairpins, repeats, dimers, and runs. Specificity testing confirmed that the primers exclusively recognize *M. tuberculosis*, indicating their strong potential for rapid and specific detection of Ethambutol resistance in clinical samples.

Keywords: Primer design, *embB* gene, in silico, *M. tuberculosis*, Ethambutol Resistance.

PENDAHULUAN

Obat anti tuberkulosis (OAT) lini pertama terdiri dari Isoniazid (INH), Rifampisin (RIF),

Pirazinamid (PZA), dan Ethambutol (EMB) (Duarte et al., 2025). Meski terapi kombinasi OAT lini pertama sangat efektif, resistensi terhadap obat-obat ini menjadi masalah serius dalam pengendalian TB

global. Jika tidak diatasi, resistensi ini dapat berkembang menjadi MDR-TB (*Multi-Drug Resistant Tuberculosis*), yang kebal terhadap setidaknya isoniazid dan rifampicin. Lalu berlanjut menjadi pre-XDR TB yang juga resisten terhadap fluorokuinolon atau salah satu dari tiga obat suntik lini kedua (Zürcher *et al.*, 2021). Kondisi ini menyebabkan pengobatan lebih lama, biaya meningkat, risiko toksisitas lebih tinggi, penularan meluas, serta kemungkinan kegagalan terapi (Li *et al.*, 2020).

Ethambutol (EMB) merupakan salah satu dari empat obat lini pertama yang digunakan dalam terapi standar tuberkulosis, umumnya dikombinasikan dengan isoniazid, rifampicin, dan pirazinamid. Selain itu, EMB juga dapat dimasukkan ke dalam regimen terapi MDR-TB pada pasien yang menjalani pengobatan jangka panjang (WHO, 2019). EMB bekerja dengan menghambat enzim *arabinosyltransferase* (EmbA, EmbB, dan EmbC) yang berperan dalam biosintesis dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* (Rattan, 1998; Safi *et al.*, 2013). EmbA dan EmbB diperlukan dalam sintesis arabinogalaktan sementara itu EmbC berperan dalam pembentukan lipoarabinomannan (LAM) (Gaude *et al.*, 2009). Enzim-enzim tersebut dikode oleh operon *embCAB* yang mengandung gen *embC*, *embA*, dan *embB* (Sun *et al.*, 2017).

Resistensi terhadap EMB sering dikaitkan dengan perubahan/mutasi yang terjadi pada gen *embB*, yang dikenal dengan sebutan “*EMB resistance determining region*” (ERDR) (Bakula *et al.*, 2013). Frekuensi mutasi di daerah ERDR (pada isolat TB dan spesies mikobakteri lainnya yang resisten terhadap ethambutol) adalah sebesar 50%–70% (Zhang *et al.*, 2020). Beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa mutasi pada kodon 306 gen *embB* (memiliki prevalensi bervariasi dari 30% hingga 87,5%) pada isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap ethambutol (Hafeez *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2021).

Mutasi *embB* mayor lainnya terdapat pada kodon 406 dan kodon 497, namun beberapa laporan mengungkapkan bahwa di antara isolat yang resisten terhadap EMB, persentase mutan *embB*406 sebesar 10% secara signifikan lebih rendah dua kali lipat dibandingkan *embB*497 (Bakula *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015). Starks *et al.* (2009) menemukan bahwa mutasi *embB*497 dapat terjadi bersamaan dengan mutasi *embB* lainnya (misalnya, pada kodon 306) dan dapat bertindak secara sinergis untuk meningkatkan tingkat resistensi.

Identifikasi mutasi dapat dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* secara *Real-Time* (RT-PCR). *Real-Time* PCR merupakan salah satu metode PCR yang dapat digunakan untuk telaah

nukleotida secara semi kuantitatif. Seperti halnya PCR lainnya, RT-PCR juga membutuhkan sepasang primer untuk membatasi daerah sekuens. Primer merupakan sekuens nukleotida pendek yang berperan penting dalam proses PCR. Kriteria primer meliputi panjang primer, %GC, *T_m* (*melting temperature*), *dimer*, *hairpin*, *run*, *repeat*, stabilitas, dan *false priming*. Desain primer dilakukan untuk memperoleh primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi DNA dengan teknik PCR (Yowani dkk., 2015).

Kemajuan bioinformatika memungkinkan desain primer secara *in silico* menggunakan perangkat lunak khusus. Penelitian ini menjadi tahapan dalam deteksi adanya mutasi gen *embB M. tuberculosis*. Tujuan khusus dari penelitian adalah merancang sepasang primer yang dapat digunakan dalam proses amplifikasi fragmen gen *embB* yang mencakup kodon 306 dan 497.

MATERI DAN METODE

Bahan

Perancangan probe menggunakan urutan nukleotida bakteri gen *embB Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*wild type*) (kode Genbank MK579314.1) yang dapat diunduh pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov.

Peralatan

Peralatan yang digunakan untuk menyelesaikan penelitian ini adalah seperangkat laptop dengan spesifikasi *Windows* 11 (bisa disesuaikan dengan *Windows* lainnya) 64 bit, *software Clone Manager Suite* 12 yang digunakan untuk perancangan primer dan serta analisis spesifisitas menggunakan *Primer-BLAST* pada situs NCBI.

Cara Kerja

Pemilihan Urutan Nukleotida Target Perancangan

Perancangan primer menggunakan keseluruhan urutan nukleotida gen *embB* dengan kode Genbank MK579314.1, yang terdiri dari 3297 nukleotida. Titik-titik mutasi yang dipilih pada penelitian ini adalah kodon 306 dan 497 *embB*. Kodon tersebut dipilih dalam penelitian ini dikarenakan, daerah tersebut memiliki frekuensi mutasi yang tinggi khususnya pada resistensi obat Ethambutol. Sekuens gen *embB M. tuberculosis* yang diperoleh selanjutnya diubah menjadi format FASTA.

Perancangan dan Analisis Primer secara In Silico

Perancangan primer dilakukan dengan mengunggah urutan nukleotida gen *embB M. tuberculosis* yang telah diunduh dalam format

FASTA ke dalam program *Clone Manager Suite 12*. Setelah itu dipilih “*linear molecule*” dan “*auto scan molecule*” kemudian di klik “*ok*”. Selanjutnya dilakukan ke tahap untuk mencari primer, langkah awalnya adalah klik ikon primer, kemudian dipilih “*design*”. Dalam tahap pemilihan primer ini diatur panjang dari primer A (*forward*) dan primer B (*reverse*) sepanjang 16-28 basa, dan kemudian ditekan “*next*”. Hal selanjutnya yang dilakukan adalah menentukan panjang daerah yang digunakan untuk mencari primer, dalam penelitian ini digunakan daerah yang bisa melewati kodon target yakni kodon 306 dan 497 gen embB. Setelah itu ditekan tombol “*finish*”, maka akan muncul beberapa pilihan primer yang akan dipilih sesuai dengan kriteria

Analisis Spesifisitas Primer secara In Silico

Uji spesifisitas primer dilakukan dengan melakukan BLAST melalui *database* NCBI. Pada halaman “BLAST”, dipilih menu “Primer-BLAST”. Kemudian dimasukan urutan nukleotida primer *forward* dan *reverse* yang digunakan pada bagian “*primer parameters*”. Pada kolom *database* diubah menjadi “*nt*” dan kolom *organism* diketik “*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*”, klik “*get primers*” untuk memunculkan hasil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Urutan Nukleotida Target Perancangan

Pemilihan urutan nukleotida target dalam penelitian ini dilakukan dengan merujuk pada hasil studi terdahulu untuk mengidentifikasi daerah genetik yang memiliki frekuensi mutasi tertinggi dan berkaitan dengan resistensi terhadap ethambutol. Kodon 306 dan 497 pada gen embB *M.tuberculosis* merupakan target pada perancangan DNA probe mutan dalam penelitian ini karena mutasinya telah diketahui berhubungan kuat dengan resistensi terhadap ethambutol. Mutasi yang dianalisis mencakup M306V (perubahan kodon ATG menjadi GTG) dan Q497R (perubahan kodon CAG menjadi CGG), yang telah dilaporkan sebagai *hotspot* mutasi pada gen embB *M. tuberculosis* resisten ethambutol (Vo *et al.*, 2024).

Mutasi M306V (Metionin → Valin) dan Q497R (Glutamin → Arginin merupakan dua perubahan variasi asam amino yang memiliki prevalensi paling tinggi dibandingkan kodon lain pada gen embB *M.tuberculosis*. Mutasi M306V terjadi akibat substitusi kodon ATG (yang mengkode metionin) menjadi GTG (yang mengkode valin).

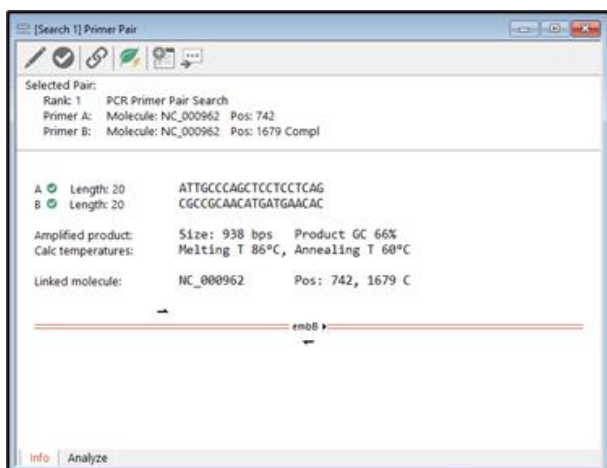
Sementara itu, mutasi Q497R terjadi akibat perubahan kodon CAG (yang mengkode glutamin) menjadi CGG (yang mengkode arginin). Mutasi kedua kodon tersebut menyebabkan perubahan struktural pada enzim *arabinosyltransferase*, yang mengakibatkan penurunan ikatan molekul pada ethambutol terhadap enzim tersebut (Bhat *et al.*, 2018)

Perancangan dan Analisis Primer secara In Silico

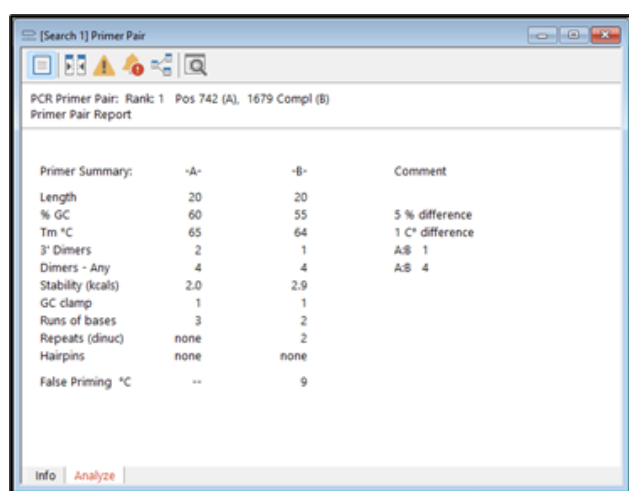
Proses perancangan primer ini diarahkan untuk mendeteksi keberadaan mutasi pada gen embB, dengan target region yang dipilih berada pada rentang 800 sampai 1600 bps, dan dilakukan *extend search* sejauh 75 basa ke kiri dan 85 basa ke kanan untuk memastikan cakupan yang optimal. Panjang primer yang digunakan disesuaikan dengan panjang optimal, yaitu 20 bps. Kriteria desain primer diatur berdasarkan sejumlah parameter penting yang mencakup %GC sebesar 40–60%, T_m berkisar antara 50–65°C. Selain itu, stabilitas primer ditentukan dengan nilai $\geq 1,2$ kJ, sementara nilai 3' dimer harus < 3 . Parameter tambahan yang diperhatikan dalam desain primer meliputi *Any homolog bases* < 7 , *Runs* < 4 , *Repeats* < 3 , *GC Clamp* ≥ 1 , dengan perbedaan GC $\pm 5\%$ GC dan perbedaan $T_m \pm 3^\circ\text{C}$ untuk memastikan primer yang dihasilkan memiliki kualitas dan kinerja optimal dalam reaksi *Real-Time PCR* (Batubara, 2024).

Hasil rancangan primer pada clone manager mendapatkan panjang sekuens dari urutan 742 hingga 1679 dengan ukuran produk PCR 938 bp. Sepasang primer tersebut meliputi primer *forward* dengan urutan sekuens 5' ATTGCCCAGCTCCTCCTCAG 3' dan primer *reverse* dengan urutan sekuens 5' CGCCGCAACATGATGAACAC 3' (20 nukleotida) (Chen *et al.*, 2011).

Primer yang baik memiliki kriteria tersusun atas 18-30 nukleotida, dengan panjang optimal 20 nukleotida. Jika lebih pendek dari 18 nukleotida maka akan mengakibatkan berkurangnya spesifisitas primer dan meningkatkan kemungkinan terjadinya *mispriming*. Primer dengan panjang lebih dari 30 nukleotida tidak meningkatkan spesifisitas secara signifikan, justru dapat meningkatkan biaya sintesis oligo, membentuk struktur sekunder yang menurunkan efisiensi PCR, serta meningkatkan risiko terbentuknya dimer primer karena primer merupakan komponen dengan konsentrasi tertinggi dalam reaksi PCR (Dorak, 2006; Handoyo dan Ari, 2000).



Gambar 1. Hasil Perancangan Primer pada Program Clone Manager Suite 12



Gambar 2. Hasil Analisis Kriteria Pasangan Primer pada Program Clone Manager Suite 12

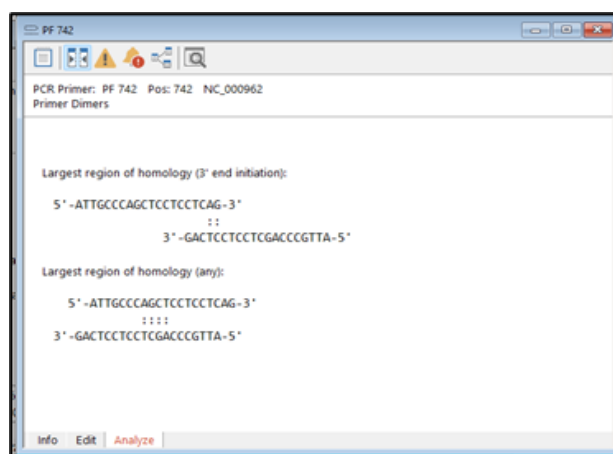
Nilai %GC yang dimiliki oleh primer *forward* dan primer *reverse* berturut-turut, yaitu 60% dan 55% yang telah memenuhi kriteria %GC yang baik. Besarnya %GC suatu primer akan mempengaruhi nilai Tm dan Ta primer tersebut. Primer dengan panjang 18 – 30 nukleotida seharusnya memiliki %GC antara 50 – 60%. Primer yang memiliki %GC yang tinggi akan memiliki nilai Tm yang tinggi pula karena terdapat lebih banyak ikatan hidrogen didalamnya (3 ikatan hidrogen) (Innis dan Gelfand, 1990).

Tm primer hasil rancangan yaitu 65 dan 64°C. Tm (*melting temperature*) merupakan temperatur saat setengah untai DNA ganda terpisah. Pada kedua primer tersebut terdapat perbedaan nilai Tm sebesar 1°C, nilai ini masih dapat diterima didasarkan pada penelitian Barlett dan Stirling (2003) yang menyatakan nilai perbedaan Tm di antara dua primer yang diperbolehkan adalah tidak boleh lebih dari 5°C (Bartlett dan Stirling, 2003).

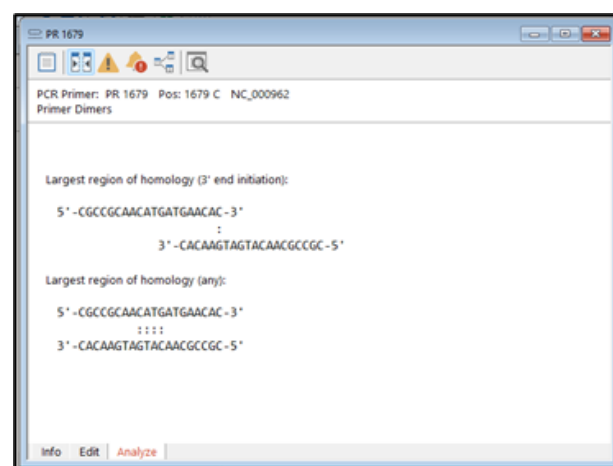
Hasil desain primer juga menunjukkan nilai GC clamp sebesar 1 pada primer *forward* dan pada

primer *reverse*. Basa G atau C yang terdapat pada ujung 3' primer ini akan membantu stabilitas ikatan antara primer dan template DNA yang diperlukan untuk polimerase dan juga membantu mendorong pengikatan spesifik pada ujung 3' dari basa G atau C. Jumlah lebih dari 3 basa G atau C pada 5 basa terakhir ujung 3' harus dihindari karena ujung 3'-nya bisa melipat membentuk struktur dimer yang mengakibatkan ujung 3' primer tidak terikat pada template. Nilai ini telah sesuai dengan kriteria yakni ≥ 1 dan ≤ 5 (Dorak, 2006).

Dimers dari pasangan primer tersebut telah memenuhi kriteria yaitu berjumlah 2 pada primer *forward* dan 1 pada primer *reverse*, dengan batas *dimers* pada 3' adalah <3 pb. Sedangkan *any dimers* pada primer *forward* dan primer *reverse* masing-masing sebanyak 4 dengan batas *any dimers* adalah <7 pb. *Dimers* menunjukkan adanya hibridisasi antar basa primer yang dapat menyebabkan kesulitan penempelan primer dengan template yang diinginkan. Apabila terdapat *dimers* pada primer maka DNA polymerase dapat mengikat bagian yang identik dan memperpanjang kedua arah. Hal ini akan mengakibatkan penurunan efisiensi amplifikasi dan spesifitasnya (Bartlett and Stirling, 2003).



Gambar 3. Analisis Dimers Primer Forward



Gambar 4. Analisis Dimers Primer Reverse

Interaksi *hairpin* pada primer sama sekali tidak diperbolehkan karena primer yang saling berkomplemen akan membentuk lipatan sehingga proses amplifikasi tidak dapat berlangsung. Primer hasil desain tidak mengalami *hairpin* sehingga telah sesuai dengan kriteria primer yang baik. Primer yang dihasilkan memiliki *repeats* sebanyak 2 pada primer *reverse* dan tidak ditemukan *repeats* pada primer *forward*. Sementara itu, ditemukan *runs* pada primer *forward* sebanyak 3 dan pada primer *reverse* sebanyak 2. Sehingga primer yang dihasilkan telah memenuhi kriteria primer yang baik, yaitu *repeats* <3 dan *runs* <4 (Borah, 2011).

Pada primer yang dihasilkan tidak ditemukan *false priming* pada primer *forward*, namun pada primer *reverse* terdapat *false priming* pada Tm 9°C. Adanya *false priming* atau kesalahan penempelan primer di luar suhu *annealing* akan mengakibatkan kesalahan pembentukan produk pada suhu tertentu sehingga hasil yang diinginkan tidak sesuai. *False priming* sering terjadi pada suhu rendah, di mana primer dapat berikatan secara non-spesifik dengan sekuens yang tidak diinginkan. Primer tersebut diperbolehkan digunakan dengan meningkatkan suhu *annealing* mendekati atau sedikit di bawah Tm primer, stabilitas ikatan non-spesifik ini berkurang, sehingga mengurangi kemungkinan *false priming* saat proses terjadi.

Analisis Spesifisitas Primer secara *In Silico*

Urutan basa primer yang diperoleh dari hasil rancangan dianalisa secara *in silico* dengan cara BLAST berdasarkan informasi *database* NCBI. Tujuan dari uji spesifisitas ini adalah untuk mengetahui apakah primer yang digunakan merupakan primer spesifik yang hanya mengamplifikasi satu jenis spesies. Kriteria yang paling penting dimiliki oleh primer ataupun probe adalah spesifik terhadap target yang diinginkan sehingga hasil pengujian tidak dapat menempel pada target yang tidak diinginkan saat amplifikasi DNA.

Penyejajaran menggunakan Primer-BLAST memungkinkan melakukan pencarian kesamaan urutan terhadap beberapa pangkalan data yang terdapat di GenBank NCBI. Dari hasil penyejajaran sekuens produk diperoleh *length* 20, Tm 60, dan *self 3' complementarity* 3.00 untuk primer *forward* serta 4.00 untuk primer *reverse*. Semakin kecil *self 3' complementarity* akan semakin baik. *Self 3' complementarity* maksimum adalah 3 (Shen *et al.*, 2010) dan maksimum pengulangan satu basa yang sama secara berurutan adalah 4 basa. Hasil primer-BLAST dari *database* NCBI, primer *forward* dan primer *reverse*, menunjukkan bahwa pasangan primer

yang dihasilkan spesifik mengenali hanya bakteri *M. tuberculosis* H37Rv.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dihasilkan sepasang primer yaitu primer *forward* gen embB dengan urutan nukleotida 5' ATTGCCAGCTCCTCCTCAG 3' dan primer *reverse* gen embB dengan urutan nukleotida 5' CGCCGCAACATGATGAACAC 3' yang telah memenuhi kriteria primer yang baik dilihat dari panjang primer, %GC, Tm, dimer pada ujung 3', stabilitas, jumlah *runs*, *repeats*, *hairpins* dan *false priming*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakuła, Z., Napiórkowska, A., Bielecki, J., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., and Jagielski, T. 2013. Mutations in the embB Gene and Their Association with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Clinical Isolates from Poland. *BioMed research international*. 167954.
- Batubara, J., Gultom, R., Hutagaol, A., Parapat, G., Marpaung, R., Hafzari, R., *et al.* 2024. Desain Primer *In Silico* Untuk Amplifikasi Genus Andaliman Dengan Aplikasi Bioinformatika. *Jurnal Biologi*, 1(4): 8-8.
- Bartlett, J. M. S., and Stirling, D. 2003. *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols* (Second Edi). Human Press Inc.
- Bhat, Z. S., Rather, M. A., Maqbool, M., and Ahmad, Z. 2018. Drug Targets Exploited in *Mycobacterium tuberculosis*: Pitfalls and Promises on the Horizon. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103: 1733-1747.
- Borah, P. 2011. Primer Designing For PCR. *Science Vision*, 11(3):134–136.
- Chen, X., Kong, F., Wang, Q., Li, C., Zhang, J., dan Gilbert, G.L. 2011. Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin, and Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(10): 3450–3457.
- Dorak, M. T. 2006. *Real-Time PCR*. New York: Taylor and Francis Group.1-30.
- Goude, R., Amin, A. G., Chatterjee, D., and Parish, T. 2009. The Arabinosyltransferase EmbC is Inhibited by Ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(10): 4138–4146.

- Handoyo, D. and Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1): 17–29.
- Hafeez, S., Sajid, H., Malik, F.Q., Zaidi, I.A.,m Niaz, S., and Iqtidar. 2021. embB Gene Association with Ethambutol drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Patients. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 15(12): 3273-3276.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J., Eds. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London.
- Khan, M. T., Ali, S., Khan, A. S., Ali, A., Khan, A., Kaushik, A. C., *et al.* 2021. Insight Into the Drug Resistance Whole Genome of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan, Infection, genetics and evolution. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 92: 104861.
- Li, M. C., Chen, R., Lin, S. Q., Lu, Y., Liu, H. C., Li, G., *et al.* 2020. Detecting Ethambutol Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Isolates in China: A Comparison Between Phenotypic Drug Susceptibility Testing Methods and DNA Sequencing Of embAB. *Frontiers in Microbiology*, 11: 781.
- Shen Z, Qu W, Wang W, Lu Y, Wu Y, Li Z, *et al.* 2010. MPprimer: a Program for Reliable Multiplex PCR Primer Design. *BMC Bioinformatics*, 11:143.
- Starks, A. M., A. Gumusboga, B. B. Plikaytis, T. M. Shinnick, and J. E. Posey. 2009. Mutations at embB codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother*, 53:1061–1066.
- Sun, Q., Xiao, T. Y., Liu, H. C., Zhao, X. Q., Liu, Z. G., Li, Y. N., *et al.* 2017. Mutations within embCAB Are Associated with Variable Level of Ethambutol Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1): e01279-17.
- Vo, T. T. B., Nguyen, D. T., Nguyen, T. C., Nguyen, H. T., Tran, H. T., and Nghiem, M. N. 2024. Exploring Gene Mutations and Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: A Study from the Lung Hospital in Vietnam. *Molecular Biology Reports*, 51(1): 1084.
- WHO. 2019. *WHO Consolidated Guidelines on Drug-Resistant Tuberculosis Treatment*. World Health Organization. Geneva.
- Yowani, S. C., Wirajana, I. N., dan Maitriani, L. K. B. 2015. Desain Primer untuk Amplifikasi Fragmen Gen inhA Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Cakra Kimia*, 3(2): 89-96.
- Zhao, L. L., Sun, Q., Liu, H. C., Wu, X. C., Xiao, T. Y., Zhao, X. Q., *et al.* 2015. Analysis of embCAB Mutations Associated with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(4): 2045–2050.
- Zhang, L., Zhao, Y., Gao, Y., Wu, L., Gao, R., Zhang, Q., *et al.* 2020. Structures Of Cell Wall Arabinosyltransferases with the Anti-Tuberculosis Drug Ethambutol. *Science*, 368(6496): 1211-1219.
- Zürcher, K., Reichmuth, M. L., Ballif, M., Loiseau, C., Borrell, S., Reinhard, M., *et al.* 2021. Mortality From Drug-Resistant Tuberculosis in High-Burden Countries Comparing Routine Drug Susceptibility Testing with WholeGenome Sequencing: A Multicentre Cohort Study. *The Lancet Microbe*, 2(7): e320-e330.