

Distribusi *M. Tuberculosis* Genotipe Beijing pada Pasien Tuberkulosis Paru di Malang

Distribution of M. Tuberculosis Genotype Beijing among Pulmonary TBC-AFB(+) Patients in Malang

Tri Yudani MR¹ dan Triwahju Astuti²

¹Laboratorium Biokimia - Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

²Bagian Paru Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRAK

Penelusuran penyebaran genetis *Mycobacterium tuberculosis* merupakan salah satu faktor penting dalam mengendalikan infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Studi mengenai distribusi *Mycobacterium tuberculosis* galur Beijing pada TB paru BTA (+) pasien di RSUD dr. Saiful Anwar rumah sakit ini dilaksanakan dengan metode *spoligotyping*. Dahak dikumpulkan dari total 41 pasien, dicuci dengan salin normal dan ditanam pada medium LJ. DNA dari bakteri yang tumbuh kemudian diisolasi dan mengalami *spoligotyping*. Sembilan belas *spoligotype* (65,5%) ditemukan dari total dua puluh sembilan sampel yang berkembang, sedangkan sepuluh sampel (34,5%) adalah *non-Mycobacterium tuberculosis*. Dari *spoligotype* sembilan belas, sembilan sampel merupakan *Beijing strain* (31%) dan sepuluh sampel (34,5%) menunjukkan *strain non Beijing*. Proporsi pasien TB yang terinfeksi, menunjukkan bahwa persentase pasien terinfeksi dengan strain Beijing hampir sama antara wanita dan pria. Ditemukan bahwa prevalensi tertinggi strain Beijing pada pasien dengan usia berkisar antara 31-40 tahun (51%). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa strain Beijing mendominasi distribusi *M. tuberculosis* pada pasien TB paru di Malang.

Kata Kunci: *Beijing strain, M. tuberculosis, Spoligotyping*

ABSTRACT

Understanding genotype distribution of *Mycobacterium tuberculosis* is important part in controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection. Study on the distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain among pulmonary TB-AFB(+) patients in dr. Saiful Anwar hospital has been conducted using *spoligotyping* method. The collected sputum from the total of 41 patients, were washed with normal saline and cultured on LJ medium. The DNA of the growing bacteria were then isolated and subjected to *spoligotyping*. Nineteen *spoligotype* (65,5%) were found from total twenty nine of growing culture, whereas ten samples (34.5%) are non-tuberculosis *Mycobacterium*. From nineteen *spoligotype*, nine samples belongs to *Beijing strain* (31%) and ten samples (34.5%) showed non *Beijing strain*. Stratification of the proportion of TB infected patients into sex and age, showed that the percentage of patient infected with *Beijing strain* almost similar between female and male. Furthermore, it was found that the highest prevalence of *Beijing strain* occur among the patients with age in the range between 31-40 years (51%). Hence it can be concluded that *Beijing strain* dominated the distribution of *M. tuberculosis* among pulmonary TB patients in Malang.

Keywords: *Beijing strain, M. tuberculosis, Spoligotyping*

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 26, No. 2, Agustus 2010; Korespondensi: Tri Yudani MR. Laboratorium Biokimia - Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang, Jl. Veteran Malang, Tel. (0341) 569117 Email: daniraras@yahoo.com

PENDAHULUAN

Keberhasilan kontrol tuberkulosis tidak bisa dipisahkan dari tiga faktor: diagnosis yang cepat dan akurat, terapi yang tepat dan penelusuran jejak penyebaran penyakit. Beberapa tahun terakhir ini deteksi keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) secara cepat sudah dapat dilakukan dengan berdasar pada teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* (1). *Spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)* merupakan salah satu diantaranya. Metoda genotyping ini mengeksploitasi keberadaan polymorfisme DNA rantai pendek yang berulang-ulang (DR=*direct repeat*) sepanjang 36-bp yang sangat *conserved* dengan *spacer* (daerah antara) yang tidak berulang-ulang (*non repetitive*) sepanjang 34-41-bp (2). Dalam metoda ini DR dijadikan target amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan cara menggunakan *spacer* yang bervariasi untuk mendapatkan pola hibridisasi yang berbeda dari DNA target yang diamplifikasi dengan oligonukleotid *spacer synthetis* yang beragam (2). *M. tuberculosis* bisa dibedakan galurnya berdasarkan jumlah DR yang ditemukan dan ada tidaknya *spacer*. Oleh karena itu, lokus DR bisa digunakan untuk membedakan galur suatu *species* (3). Keunggulan lain dari penggunaan teknik ini karena berbagai galur *M. tuberculosis* bisa sekaligus ditemukan dalam waktu yang sama dan dalam jumlah sampel yang besar dengan tingkat reproduksi yang tinggi (4). Sampai saat ini *Spoligotyping* sering dipakai dalam usaha mencari jejak transmisi penyakit infeksi yang lain, karena merupakan metoda yang sederhana, cepat dan terpercaya untuk mendeteksi *M. tuberculosis* secara serentak dan sekaligus dapat membedakan galur *M. tuberculosis* tanpa harus mengkulturkan bakteri terlebih dahulu atau mempurifikasi DNA.

Walaupun prevalensi TBC di Indonesia sangat besar, namun sampai sekarang masih belum diketahui jenis galur *M. tuberculosis* yang dominan menyerang kebanyakan pasien TBC pada setiap provinsi, mengingat perbedaan geografis pada banyak provinsi (5). Hal ini penting mengingat galur yang berbeda memiliki karakter berbeda pula seperti kecenderungan untuk memiliki resistensi terhadap antibiotik. Dengan demikian apabila pada suatu daerah sudah diketahui galur dominan yang menyerang penderita TBC, hal ini akan memudahkan terapi serta pencegahan penularan selanjutnya. Di beberapa Negara Asia Tenggara seperti Cina, Korea dan Hongkong galur *M. tuberculosis* yang dominan sudah diketahui, kebanyakan (86%) merupakan galur genotip Beijing. Keluarga Beijing berkaitan sangat erat dengan transmisi tuberkulosis yang resistan terhadap obat anti tuberkulosis di Jerman, Kuba, Rusia dan Afrika Selatan (6-10). Di Amerika, galur W yang memegang rekor tingginya angka resistensi, merupakan keluarga Beijing juga (11-13). Dengan demikian metoda ini cocok digunakan untuk mengidentifikasi galur *M. tuberculosis* yang menyerang penderita TBC. Tujuan dari studi ini adalah untuk mengetahui sebaran *M. tuberculosis* galur Beijing yang menyerang sejumlah pasien suspek TBC di RSSA Malang menggunakan *spoligotyping*.

METODE

Sampel

Sebanyak 41 sampel sputum diambil dari pasien TBC paru

yang dirawat jalan di Poli Paru, RSSA, Malang pada bulan Januari sampai Agustus 2006. Diagnosa tuberkulosis berdasar pada pemeriksaan klinis, foto rontgen dan deteksi BTA pada sputum dengan pengecatan *Ziehl-Neelsen*. Pasien sebelumnya sudah menyatakan persetujuannya untuk ikut serta dalam studi ini dengan diminta menandatangani *informed consent*.

Pertumbuhan Bakteri

Sputum didekontaminasi dengan cara dicuci dengan larutan NaCl 0.9%. sebelum *M. tuberculosis* ditumbuhkan pada media LJ (2) dan diinkubasikan pada temperatur 37°C. Pengamatan dimulai setelah tiga minggu sejak penanaman. Penumbuhan kultur dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, RS Paru, Batu.

Isolasi DNA

DNA bakteri diisolasi menurut van der Zanden (14). dipanen dengan cara mengeruk 10-15 koloni dengan ose steril kemudian dicelupkan kedalam 500 µl air steril yang sudah disiapkan dalam *eppendorf* (2). *Eppendorf* dipanaskan di dalam *water bath* pada 95°C selama 15 menit. Setelah itu sampel DNA disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 13.000xg. Supernatan yang paling atas yang mengandung DNA diambil 400 µl disimpan pada 4°C dan siap untuk digunakan untuk tahapan selanjutnya yaitu amplifikasi DNA dengan PCR.

Setelah dua minggu diinkubasikan pada 37°C sudah terlihat pertumbuhan pada beberapa kultur, tetapi karena baru sebatas lapisan lendir maka tidak dilakukan pemanenan. Pada 11 tabung didapati kontaminasi sehingga tahap berikutnya hanya digunakan 30 sampel. Pada minggu ke tiga koloni *Mycobacterium* yang khas berbentuk seperti bunga kol terlihat tumbuh pada sebelas tabung. Pemanenan lalu dilakukan pada saat itu. Pada minggu ke empat pemanenan dilakukan pada empat belas tabung lagi dan sisanya setelah minggu ke lima. Hanya dua puluh sembilan sampel bisa digunakan karena 1 sampel tidak tumbuh. Pemanenan bakteri dilakukan dengan cara mengeruk koloni sebanyak-banyaknya dengan ose yang sebelumnya sudah disterilkan. Koloni kemudian dicelupkan pada dH₂O steril yang sebelumnya sudah ditempatkan dalam *eppendorf*.

Spoligotyping

Pelaksanaan *Spoligotyping* dilakukan di Laboratorium Patologi Klinis, RS Hasan Sadikin, Bandung. Tahap *spoligotyping* terdiri dari *amplifikasi* dan *blothing hibridisasi*

Amplifikasi DNA dengan PCR

Sebanyak 10 ng DNA genom *Mycobacterium sp* digunakan sebagai target *spoligotyping*. Untuk PCR, disiapkan 50 µl campuran terdiri dari: PCR *buffer* (5mM Tris-HCl, 5mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, pH9), *deoxynukleotida triphosphat* 8 µM, 1,2 pmol tiap primer DRa dan DRb (Tabel 1), 10 ng DNA dan 5 U Tag *polymerase*. DNA dalam campuran diamplifikasi dengan bantuan mesin PCR dengan program: pemanasan selama 3 menit pada 96°C, dan dilanjutkan dengan siklus 35 kali, tiap siklus terdiri dari: 1 menit (96°C), 1 menit (55°C) dan 30 detik (72°C).

Tabel 1. Gen Primer

1:	ATAGAGGGTCGCGTTCTGGATCA
2:	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG
3:	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA
4:	ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG
5:	TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA
6:	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTC
7:	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC
8:	CGTGAACCGCCCCAGCCTCGCCG
9:	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC
10:	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC
11:	GTGAGCAACGGCGGCGGCAACCTGG
12:	ATATCTGCTGCCCGCCGGGAGAT
13:	GACCATCATTGCCAECCCTCTCCC
14:	GGTGTGATGCGGATGGTTCGGCTCGG
15:	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTTCC
16:	CGAGTTCCCGTCAGCGTCGTAAATA
17:	GCGCCGGCCGCGCGGATGACTCCG
18:	CATGGACCCGGGGCAGCTGCAGATG
19:	TAAGTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT
20:	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA
21:	TCGATGTCGATGTCCCAATCGTCGA
22:	ACCGCAGACGGCAGATTGAGACAA
23:	AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG
24:	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG
25:	CATCAGCGACCACCGCACCTGTCA
26:	CTTCAGCACACCATCATCCGGCGC
27:	GGATTCTGATCTCTCCCGCGGAT
28:	TGCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC
29:	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA
30:	GGTTGCCCGCGCCCTTTCCAGCC
31:	TCAGACAGTTTCGCGTGCATCAAGT
32:	GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTC
33:	GACATGACGGCGTGCCGCACTTGA
34:	AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA
35:	TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC
36:	CGAAATCCAGCACCATCCGACG
37:	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCTT
38:	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC
39:	GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG
40:	CGCCATCTGTGCCTCATAAGGTCC
41:	GGAGCTTTCCGGCTTCTATCAGGTA
42:	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC
43:	CGCAGAATCGACCGGGTGCGGGAG

Blotting Hibridisasi

Membran dibersihkan dengan 2xSSPE/0,1% SDS pada 60°C. Sementara itu produk PCR didenaturasi pada *thermocycle* 99°C selama 10 menit.

Produk hasil amplifikasi dihibridisasi dengan suatu set primer yang terdiri dari 43 oligonukleotida yang sebelumnya difiksasi pada membran. Tiap primer mengacu pada *spacer sequence* DNA pada *locus* DR. Paralel dengan amplifikasi DR, membran diaktifkan dengan 16%(WT/vol) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)

carbodiimide. Kemudian oligonukleotida diteteskan ke membran menggunakan alat bloting mini. Setelah inkubasi pendek, membran diaktifkan dengan 100mM NaOH, dicuci dengan 2x SSPE (1xSSPE berisi 0,18M NaCl, 10mM NaH₂PO₄ dan 1mM EDTA pH 7,7) sebelum ditambah dengan 0,1% SDS.

20 µl produk PCR dilarutkan dalam 150 µl 2x SSPE-0,1% SDS dan didenaturasi melalui pemanasan. Sampel yang diencerkan (130 µl) dipipetkan ke saluran dengan posisi sejajar satu sama lain. Hibridisasi dilakukan 60 menit pada 60°C. Setelah hibridisasi, membran dicuci dengan 250ml 2x SSPE-0,5% SDS x 10 menit pada 60°C, diinkubasi dalam konjugat *streptavidin-peroxidase* yang telah diencerkan 1:4000 selama 45-60 menit pada 42°C. Membran dicuci lagi 2x10 menit dalam 250ml 2x SSPE-0,5% SDS pada 42°C dan dibersihkan dalam 250ml 2x SSPE-0,5% SDS 5 menit pada temperatur kamar.

Deteksi Hibridisasi

Untuk mengetahui pola *spoligotype* dari masing-masing sampel dilakukan dengan menggunakan ECL *chemiluminescent*, diikuti dengan pencetakan di film rontgen. Sampel untuk kontrol pada prosedur ini dilakukan seperti dalam petunjuk dari Groenen (14).

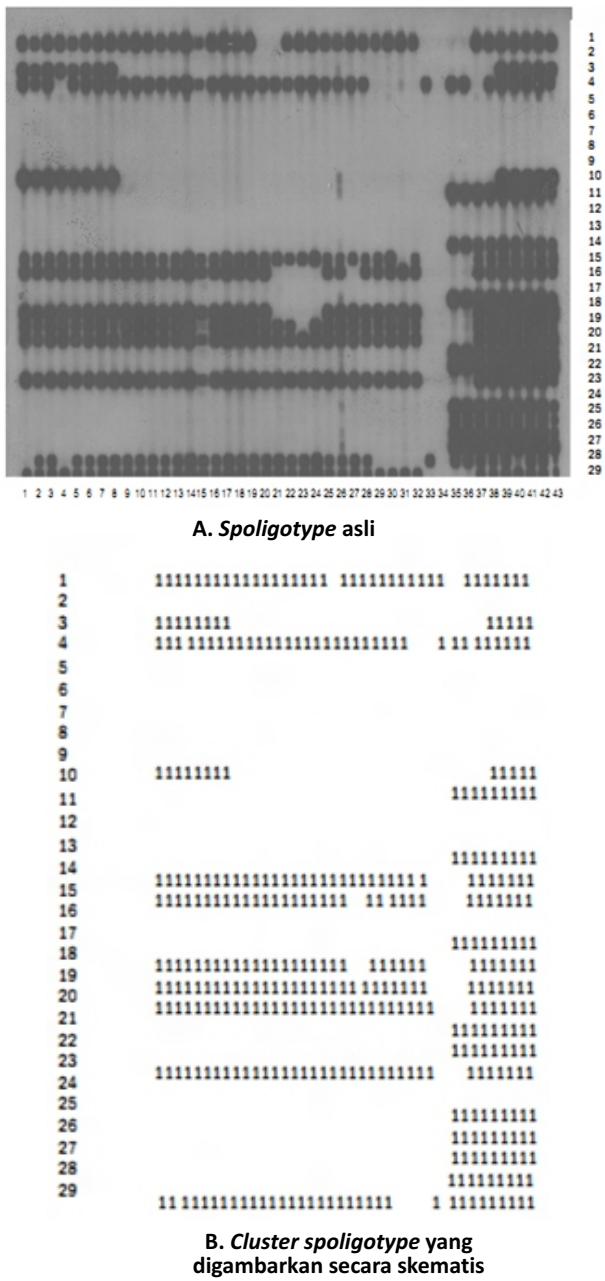
Hasil *Spoligotyping* kemudian dibandingkan dengan uji mikroskopis. Identifikasi galur dari *M tuberculosis* dilakukan dengan cara membandingkan *spoligotype* dengan pola galur-galur *M tuberculosis* yang telah diidentifikasi sebelumnya (15).

HASIL

Dari 41 sputum penderita TBC yang dikoleksi dari Rumah Sakit dr Saiful Anwar, seluruh sediaan dikultur dengan hasil BTA positif pada kultur media LJ. Proporsi pasien yang terinfeksi *Mycobacterium* galur Beijing distratifikasi dengan jenis kelamin dan umur. Prosentase pasien yang terinfeksi oleh *M. tuberculosis* galur Beijing didapatkan hampir sama pada wanita maupun yang pria. Selanjutnya ditemukan bahwa prevalensi galur genotip Beijing pada pasien dengan kisaran usia 31-40 tahun lebih tinggi (51%) dibanding pada kisaran usia lainnya mulai dari 20 tahun sampai 60 tahun (Tabel 2).

Tabel 2. Karakteristik isolat *M. tuberculosis* kompleks hasil isolasi dari pasien TB di RSSA-Malang berdasarkan jenis kelamin dan kelompok umur.

Karakteristik	Jumlah (%) isolat genotip non-Beijing	Jumlah (%) isolat genotip Beijing	Total
Total	20 (69%)	9 (31%)	29
Sex			
- Laki	12 (41%)	2 (7%)	14
- Perempuan	8 (55%)	7 (46%)	15
Grup Usia (th)			
- <20	2 (7%)		2
- 21 - 30	3 (10.3%)	3 (10.3%)	6
- 31 - 40	11 (37.9%)	4 (14%)	15
- 41 - 50	0 (0%)	3 (10.3%)	3
- 51 - 60	3 (10.3%)		3



Gambar 1. Hasil spoligotyping dari 29 isolat sampel *M. tuberculosis* kompleks yang diisolasi dari pasien TB di RSSA Malang.

Spoligotyping hanya dilakukan terhadap DNA bakteri isolat yang tumbuh setelah dikulturkan yaitu sebanyak 29 sampel. Sembilan belas spoligotype (65,5%) ditemukan dari total dua puluh sembilan sampel galur (Gambar 1 dan Tabel 3) yang ditunjukkan dengan munculnya titik-titik noktah hitam pada film setelah dicetak. Sedangkan sepuluh sampel (34,5%) merupakan *Mycobacterium* dari galur *non-tuberculosis* (gambar 1 sampel 2,5,6,7,8,9,12,13,17,25 dan Tabel 3) yang ditunjukkan dengan tidak munculnya noktah hitam. Analisa lebih detail pada pola cluster spoligotype dilakukan dengan membandingkan dengan pola-pola spoligotype yang sudah teridentifikasi di Data Bank, memperlihatkan bahwa dari sembilan belas spoligotype yang ditemukan di Malang, sembilan isolat (31%) menunjukkan pola cluster khas *M. tuberculosis* galur Beijing yang dicirikan dengan terdapatnya 9 spacer pada akhir lokus (Gambar 1

sampel 11,14,18,22,23,26,27,28 dan 29; Tabel 3), sedangkan sepuluh sampel (34,5%) tergolong *non*-galur Beijing (Gambar 1 sampel 1,3,4,10,15,16,19,20,21,24; Tabel 3). Dari sepuluh sampel, dua sampel tidak bisa teridentifikasi karena tidak terdapat kesamaan dengan pola manapun yang ada di Bank data (Gambar 1 sampel 3 dan 10)

Tabel 3. Sembilan kelompok cluster spoligotype yang ditemukan dari data base spoligotyping (spoDB4) pada 29 isolat *M. tuberculosis* kompleks yang diisolasi dari pasien TB

No	Pola cluster	Sampel No*	Jumlah cluster	%
1		11,14,18,22,23,26,27,28,29	9	31
2		15	1	3.4
3		16	1	3.4
4		19	1	3.4
5		20	1	3.4
6		21,24	2	6.8
7		4	1	3.4
8		3,10	2	6.8
9		1	1	3.4
10	ND	2,5,6,7,8,9,12,13,17,25	1	3.4

Ket: sampel no mengacu pada gambar 1.
ND: spacer tidak terdeteksi

DISKUSI

Pada penelitian ini, pengkulturan menjadi faktor penentu arah proses selanjutnya yaitu spoligotyping. Jika hasil pengkulturan sangat baik dan bebas kontaminan, dalam waktu tiga minggu bakteri sudah bisa dipanen, dengan demikian 'proses spoligotyping' juga dapat dilakukan lebih awal. Pada penelitian ini, tingkat kontaminasi pada kultur cukup tinggi (25%). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh sampel yang sudah lama disimpan, karena menunggu terkumpulnya semua sampel dan kurang sempurnanya dekontaminasi sputum dengan NaCl. Jika proses pencampuran tidak sempurna akan banyak terdapat kontaminan yang hidup (13). Apabila hambatan pada teknik pengkulturan tidak diatasi, maka metoda spoligotyping yang seharusnya mempunyai keunggulan dari sisi efisiensi waktu dibandingkan dengan metoda konvensional yang memakan waktu 2 bulan tidak akan dapat tercapai. Untuk mengatasi masalah ini, mungkin bisa dilakukan dengan melakukan dekontaminasi dengan lebih cermat dan penanaman langsung setelah pengambilan sampel sputum.

Studi mengenai prevalensi keluarga genotip Beijing di Indonesia belum dilakukan secara merata di seluruh provinsi, baru di lakukan di Jawa Barat dan Propinsi Timor bagian Barat (5). wilayah Indonesia sangat luas dengan perbedaan geografis dan kepadatan penduduk yang cukup ekstreem pada beberapa provinsi yang dapat mempengaruhi epidemi TBC. Penelitian ini merupakan studi pendahuluan dalam rangkaian pencarian galur lokal *M. tuberculosis* dari Jawa timur yang dimulai dari Malang. Kasus TB di kota Malang bisa dikatakan cukup tinggi (95 kasus/100.000 jumlah penduduk). Malang merupakan kota kecil yang cukup padat dengan penduduk yang heterogen, walaupun demikian diasumsikan bahwa variasi penduduk Malang tidak terlalu besar seperti di kota besar lain di Jawa yang pendatangnya banyak berasal dari luar

Jawa.

Dari hasil analisa dengan metoda *Spoligotyping*, didapatkan sembilan dari dua puluh sembilan sampel (31%) merupakan keluarga genotip Beijing. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan di Jawa Barat bahwa galur Beijing juga merupakan galur dominan (33%) yang menyerang penderita TBC di kedua kota tersebut (5). Temuan ini sangat berbeda dengan yang diketemukan dari Propinsi Timor bagian Barat, bahwa galur Beijing tidak mendominasi (14%) isolat yang diketemukan (5). Hal ini dapat disebabkan kepadatan penduduk di daerah Malang lebih tinggi dibandingkan dengan kepadatan penduduk di propinsi Timor bisa mempercepat transmisi.

Hal lain yang menarik dari studi ini diketemukannya cukup banyak sampel (31%) yang tidak termasuk spesies *M. tuberculosis* yang infeksius melainkan golongan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, yang melalui metoda pengkulturan konvensional perbedaan spesies ini tidak akan terlihat secara *morphologis*, akan tetapi bisa teridentifikasi melalui metoda *Spolygotyping*. Temuan ini sangat bermanfaat terutama bagi para klinisi sebagai dasar terapi antibiotik pada TBC. Selama ini semua pasien suspek TBC langsung diterapi dengan antibiotik. Berdasarkan studi ini tidak semua pasien TBC-BTA(+) terserang *M. tuberculosis* yang bersifat infeksius. Dengan demikian melalui metoda *spoligotyping* pasien bisa terhindar dari terapi yang sebenarnya tidak perlu.

Kenyataan bahwa proporsi pasien TBC yang terserang *M. tuberculosis* genotip Beijing yang diketemukan diantara individu dengan usia lebih tua (kisaran usia 31-40 tahun

dan 41-50 tahun) dibanding diantara kelompok yang lebih muda (kisaran usia < 20 tahun dan 21-30 tahun) menepis kemungkinan bahwa galur keluarga Beijing merupakan galur baru yang masuk ke daerah Malang. Galur ini sudah lama tersebar di daerah ini. Lebih lanjut tidak diketemukannya galur Beijing pada individu dibawah usia 20 tahun memperlihatkan bahwa mungkin galur ini sudah tidak mendominasi lagi dan bisa jadi bukan lagi menjadi penyebab utama penularan TBC dalam masyarakat berusia muda. Bahkan dua sampel sputum yang diambil dari pasien suspek TBC pada usia dibawah 20 tahun memperlihatkan spesies *non-tuberculosis Mycobacteria*.

Hasil studi ini berbeda dengan studi yang dilakukan di Jawa Barat, yang memperlihatkan tidak adanya hubungan antara genotip Beijing dan usia (5). Namun demikian karena terlalu sedikitnya data, maka studi ini masih harus dilanjutkan untuk menemukan adanya galur lain atau mungkin galur lokal yang mulai menyerang anak-anak. Dalam studi ini diketemukan 2 *cluster* (Gambar 1 sampel 3 dan 10) yang tidak sama dengan *cluster* manapun yang berada di database *spoligotype* internasional (15). Apakah *cluster* ini merupakan *cluster* baru, penelitian selanjutnya sangat diperlukan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada ibu Sofi dari Laboratorium Mikrobiologi, RS Paru, Batu, yang telah banyak membantu menumbuhkan *M. tuberculosis* dan Dr. Ida Parwati dari Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung yang memfasilitasi pelaksanaan teknik *Spoligotyping*. Penelitian ini dibiayai dengan dana DPP-SPP dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wird IRIN. *Indonesia: Overcrowding fuels TB in prisons*. (Online) 2010. <http://www.IRINnews.org> [diakses tanggal 5 September 2008].
2. Kamerbeek J, Scouls L, Kolk A, *et al*. *Simultaneous Detection and Strain Differentiation of Mycobacterium tuberculosis for Diagnosis and Epidemiology*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35:907-914.
3. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, *et al*. *Epidemiological Evidence of the Spread of a Mycobacterium tuberculosis Strain of the Beijing Genotype on Gran Canaria Island*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001; 164: 1165-1170.
4. Van Soolingen D. *Molecular Epidemiology of Tuberculosis and Other Mycobacterial Infections: Main Methodologies and Achievements*. *Journal of Internal Medicine*. 2001; 249: 1-26.
5. Parwati I, Van Crevel R, Sudiro M, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis Population Structures Differ Significantly on Two Indonesian Islands*. *Journal Clinical Microbiology*. 2008; 46(11):3639-3654.
6. Niemann S, Reusch-Gerdes S, and Richter E. *IS6110 Fingerprinting of Drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Germany during 1995*. *Journal Clinical Microbiology*. 1997; 35(12): 3015-3020.
7. Diaz R, Kremer K, de Haas PE, *et al*. *Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Cuba Outside of Havana. July 1994-June 1995: Utility of Spoligotyping Versus IS6110 Restriction Fragment Length of Polymorphism*. *International Journal Tuberculosis Lung Disease*. 1998; 2(9): 668-743.
8. Krummer AS, Hoffner E, Sillastu H, *et al*. *Spread of Drug Resistant Pulmonary Tuberculosis in Estonia*. *Journal Clinical Microbiology*. 2001; 39(9): 3339-3345.
9. Narvskaya O, Mokrousov L, Limeschenko E, *et al*. *Molecular Characterization of Mycobacterium tuberculosis Strains from the Northwest Region of Russia*. (Online.) <http://www.epinorth.org/english/2000/2/002c.shtml> [diakses tanggal 5 September 2008].
10. Tounousova OS, Sandven P, Mariandyshv AO, Nizovtseva NI, Bjune G, and Cougant DA. *Spread of Drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Strains of the Beijing Genotype in the Archangel Oblast, Russia*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(6): 1930-1937.
11. Agerton TB, Valway SE, Blinkbora RJ, *et al*. *Origin and Interstate Spread of a New Yoork City Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis Clone Family*. *The Journal of The American Medical Association*. 1996; 275(6): 452-457.
12. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, *et al*. *Identification of a W*

- Variant Outbreak of Mycobacterium tuberculosis f via Population-based Molecular Epidemiology.* The Journal of The American Medical Association. 1996; 75(6): 2321-2327.
13. Van der Zanden A. *Spoligotyping, a Tool in Epidemiology, Diagnosis and Control of Tuberculosis.* [Thesis]. Bilthoven, The Netherlands. 2002.
 14. Groenen PMA, Buncschoten AE, van Soolingen D and van Embden JDA. *Nature of DNA Polymorphism in the Direct Repeat Cluster of Mycobacterium tuberculosis; Application for Strain Differentiation a Novel Method.* Moleculal Microbiology. 1993; 10(5): 1057-1065.
 15. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis Complex Genetic Diversity: Mining the Fourth International Spoligotyping Database (SpolDB4) for Classification, Population Genetics and Epidemiology.* BioMed Central Microbiology. 2006; 6: 23.