

STUDI PEMETAAN AWAL DNA *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX SECARA Spoligotyping PADA HASIL ISOLASI DAHAK PASIEN TUBERKULOSIS PARU DARI 10 IBU KOTA PROPINSI (BAGIAN I)

Vivi Lisdawati¹, Ida Parwati², Pratiwi Sudarmono³, T. Mirawati Sudiro.³, Ririn Ramadhany¹, Nelly Puspendari¹, Lutfah Rif'ati¹ dan Triyani S.¹

¹ Puslitbang. Biomedis dan Farmasi, Badan Litbangkes., Kemenkes. RI

² Bagian Departemen Patologi Klinis, Rumah Sakit Hasan Sadikin.

³ Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran – Universitas Indonesia

Abstract. Mapping TB genotype of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is an important study to identify their distribution or characteristic and also may lead to improve control of the disease. This study conducted a preliminary mapping of the tubercle bacilli which had been circulating in Indonesia. Cultures of DNA isolated from TB patients at urban areas in 16 provinces in Indonesia, are chosen based on TB Case Detection Rate (CDR) 2006 from Indonesia Directorate General of Communicable Disease Control and Environment Health (Ministry of Health), were analyzed by spoligotyping for strain differentiation. In this first part, the analyzed result only came from urban areas in 10 provinces, i.e. Palembang, Bandar Lampung, Serang, Jakarta, Bandung, Surabaya, Banjarmasin, Makassar, Pontianak and Ambon.

Sample were 269 DNA from 294 isolates collected from sputum of suspect TB patients with sputum-smear positive (SS+) and age above 15 years old. All samples were obtained from peripheral health laboratory in each province. The procedure collection is accordance to Indonesia DOTs guidelines (AFB smears) and samples were transported from those 10 areas to Bacteriology Laboratory at CBPRD. Sputum was taken for culture in liquid media MGIT Bactec 960 and solid media Lowenstein Jensen. The DNAs from positive liquid media MGIT Bactec 960 were isolated and analyzed by spoligotyping to identify the spoligo pattern. The spoligotyping results converted into octal format within Words & Excel spreadsheets and compared to International Spoligotype-database (SpolDB4).

The previous study (Parwati et.al.) found some differences geographical distribution between Beijing genotype strain of tubercle bacilli in West Indonesia compare to East Indonesia, and the same pattern was also found in this study. Furthermore, the results in this study showed the differences in spoligo pattern of Mtb complex at 10 urban areas in West, Middle and East Indonesia. The percentage of Beijing strain family in the samples from West Indonesia showed around 26.61% (31.48% in Sumatra, 28.83% in Java and 16.98% in Kalimantan); from the Middle Indonesia around 25.93%; and none were found in samples from the East Indonesia. The SpolDB4 pattern also showed that the majority of isolates

belonged to major clades of M.tuberculosis, i.e. the East African-Indian (EAI); Haarlem (H), Latin American-Mediterranean (LAM), the Central and Middle Eastern Asian (CAS); U = undefined; T = T family; and the MANU/ Manu family. We also found some isolates of Mycobacterium bovis. There were no significant association showed between genotype families and gender, but strong significant association found with ethnics and geography. Further confirmation of the results is still ongoing (κ value; RFLP and MIRU-VNTR). As conclusion, this study constituted a first attempt to describe the preliminary mapping of genetic population structure of the tubercle bacilli circulating in Indonesia.

Key words: preliminary mapping, Mtb complex, spoligotyping, Beijing genotype strain. SpolDB4

PENDAHULUAN

Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization*) dalam *Annual Report on Global TB Control 2006* masih menetapkan Indonesia, di antara 22 negara lain (*the 22 high-burden countries*), pada urutan ketiga sebagai negara dengan pengidap Tuberkulosis (TB) Paru terbanyak sesudah India dan Cina. ⁽¹⁾ Data Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan (P2PL) tahun 2006 menyebutkan estimasi kasus baru di Indonesia sebesar 275 kasus/100.000 penduduk per tahun. ⁽²⁾ Laporan *WHO Global Tuberculosis Control Report 2009* bahkan menuliskan adanya estimasi kasus TB baru sebesar 528,063 kasus dengan *incidence rate* 102 kasus dahak baru dengan *smear-positive* (SS+) per 100,000 populasi pada tahun 2007. ⁽³⁾ Laporan WHO lain juga menyebutkan tentang estimasi kasus sebesar 6,427 pasien baru dengan SS+ MDR-TB pada tahun 2007, atau sekitar 2 persen dari keseluruhan kasus baru, dimana 20 persen kasus MDR-TB diprediksi akan teridentifikasi pada kasus terapi ulang (*re-treated case*). ⁽⁴⁾ Laju MDR-TB meski masih relatif rendah (kurang dari 3%), tetapi jumlah keseluruhan dari kasus MDR TB dibandingkan besarnya jumlah penderita TB di Indonesia cukup meng-

khawatirkan. Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Badan Litbangkes Depkes RI tahun 2007 mencantumkan penderita TB di Indonesia telah mencapai jumlah Prevalensi Nasional Tuberkulosis Paru sebesar 0,99% (berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan dan keluhan responden). ⁽⁵⁾

Penyakit TB disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) yang masuk ke dalam tubuh penderita melalui saluran pernafasan. Bakteri *Mtb* yang saat ini dikenal merupakan subspecies *Mtb* complex (compl.), terdiri dari galur *M. tuberculosis*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* *Bacille Calmette-Guerin* (*BCG*), *M. africanum* (subtype I-II), *M. microti*, *M. canettii*, *M. tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. *nov*, dan *M. Pinnipedii*. ^(6, 8) Semua subspecies memiliki kedekatan *phylogenetic* dan identifikasi molekular menunjukkan bahwa pada gen tertentu di daerah spesifik terdapat sekuens asam amino homolog. ^(9, 10) Hal ini terlihat pada gen *gyrase* B dari subspecies *M. africanum* dengan *Mtb*, ataupun *M. bovis* dengan *M.tb*. Sedangkan berdasarkan analisis karakteristik biokimia dapat dilihat contoh pada *subtype* I *M. africanum* yang lebih mendekati karakteristik *M. bovis* sedangkan *subtype* II lebih mendekati *Mtb*. ^(11, 12) Beberapa subspecies memiliki

kemampuan alami untuk bersifat resisten terhadap sejumlah Obat anti-TB (OAT), misalnya *M. bovis* subsp. *bovis* dan *M. canetti* yang bersifat resisten terhadap pyrazinamide tetapi masih sensitif terhadap Rifampicin dan INH. Serta galur famili *W-Beijing* cenderung resisten terhadap beberapa OAT dan juga vaksin BCG. ^(13, 14) Kemampuan resistensi bakteri timbul dari mutasi alamiah gen yang berperan pada mekanisme kerja OAT, diantaranya mutasi di gen *pncA* (resistensi terhadap pyrazinamid), *rpoB* (resistensi terhadap rifampicin), *katG* (resistensi terhadap INH), atau gen *gyrB* (resistensi terhadap quinolon) pada bakteri. ^(15, 16)

Filogenetik *Mtb* berhubungan erat dengan filogeografik, dimana berdasarkan populasi terbesar sering dikelompokkan atas famili *Beijing* dan non-*Beijing* dengan mayoritas galur bakteri *Mtb* compl. terlihat berbeda antara suatu daerah dengan daerah lain. ^(9, 17) Beberapa penelitian menyebutkan bahwa galur famili *W-Beijing* dari spesies *Mtb* bersifat lebih virulen dan berdasarkan karakteristiknya cenderung menyebabkan resistensi terhadap beberapa OAT sekaligus. Pemetaan genotipe galur famili *Beijing* di Indonesia menjadi penelitian penting untuk mengidentifikasi distribusi dan karakteristiknya sehingga dapat digunakan dalam program penanggulangan penyakit TB. ⁽¹⁸⁾

Identifikasi genotipe bakteri *Mtb* dapat dilakukan dengan berbagai metode molekular, antara lain: *IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) fingerprinting*, *Spoligotyping*, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat (MIRU – VNTR) typing*, atau metode *Randomly Amplified Polymorphic DNA* dan *DNA sequencing*. ^(19, 20, 21) Metode dan peralatan paling sederhana dan sering menjadi pilihan adalah teknik *spoligotyping*

(*spacer-oligo-typing*) yang sering digunakan untuk mengidentifikasi spesifisitas *phylogenetic* basilus *Mtb* yang bersirkulasi di suatu negara. ^(14, 22)

Tulisan ini adalah bagian awal dari hasil penelitian pendahuluan untuk pemetaan (*preliminary mapping*) distribusi bakteri *Mtb* complex di Indonesia, terutama galur famili *W-Beijing*, menggunakan metode *spoligotyping*. Penelitian bersifat *cross sectional experimental* dan dilaksanakan pada tahun 2008 - 2009. Identifikasi keseluruhan ditujukan pada isolat spesimen dahak pasien TB yang dikumpulkan dari 10 ibu kota propinsi, yaitu: Bandar Lampung, Palembang, Serang, Jakarta, Bandung, Surabaya, Banjarmasin, Pontianak, Makassar dan Ambon. Dari 10 kota lokasi penelitian yang dianalisis, terdapat 5 kota berada di 5 propinsi yang menyandang angka prevalensi TB di atas angka prevalensi TB Nasional data Riskesdas 2007 ⁽⁵⁾, yaitu: Jakarta (DKI Jakarta), Serang (Banten), Banjarmasin (Kalimantan Selatan), Pontianak (Kalimantan Barat), dan Makassar (Sulawesi Selatan).

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Biosafety Laboratory Level 2 (BSL-2) – Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Biomolekular, Puslitbang Biomedis dan Farmasi, pada bulan November 2008 - Juli 2009.

BAHAN DAN CARA

Bahan Sampel

Sampel terdiri dari 269 isolat spesimen dahak *sps* pasien TB dari 10 ibu kota propinsi di lokasi penelitian. Kriteria inklusi: Pasien adalah pria dan wanita dengan usia ≥ 15 tahun; merupakan pasien kasus TB baru atau dalam pengobatan

(maksimal 2 bulan); diidentifikasi sebagai “suspek” dan memiliki hasil *sputum smear positif* (*ss+*); serta telah menandatangani *informed consent* penelitian. Kriteria eksklusi: Pasien yang tidak dapat mengeluarkan dahak; Identitas tidak terlampir; Sampel dahak rusak, terlalu sedikit, kering atau terkontaminasi.

Cara Kerja

A. Dekontaminasi Dahak

Pengerjaan dilakukan di dalam Biosafety Cabinet (BSC) Type IIA, menggunakan prosedur baku BSL-3, Laboratorium Bakteriologi - BMF.

Sampel (dahak) diolah menggunakan kit reagen komersial sesuai prosedur distributor (Becton Dickinson, Spark, MD). Sampel yang diterima dalam pot dahak standard WHO dibuka di BSC lalu didekontaminasi dengan *N-acetylsystein* (NALC)/NaOH untuk menghilangkan kontaminasi silang. Sampel dalam tabung falcon dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* selama 5-20 detik, lalu biarkan selama 15-20 menit. Tambahkan buffer fosfat steril pH 6,8 lalu spesimen dipekatkan menggunakan sentrifuse 3.000x g selama 15 menit. Larutan supernatan dibuang dan resuspensi endapan dengan bufer fosfat hingga volume 1 – 3 mL. Simpan di inkubator pada suhu 37°C selama 15 menit, kemudian sample dibagi dua untuk sebagian disiapkan guna pembuatan kultur (media cair MGIT-Bactec 960 dan media padat Lowenstein Jensen) dan sebagian lagi disiapkan untuk ekstraksi DNA (DNeasy Blood and tissues kit, QIAamp Diagnostics Qiagen).

B. Pembuatan Kultur Media Cair MGIT-BACTEC 960

Pengerjaan dilakukan di dalam BSC Type IIA, menggunakan prosedur baku

BSL-3, Laboratorium Bakteriologi – BMF.

Suspensi dahak disiapkan untuk sejumlah seri larutan lalu ditambahkan ke dalam medium campuran MGIT-Bactec 960 (BD, Spark, MD) siap pakai yang mengandung campuran agar Middlebrook 7H9, mycobactin J dan indicator fluoressein. Kemudian ditambahkan campuran MGIT suplemen (BD, Spark, MD), media agar (BD, Spark, MD) dan larutan VAN (BD, Spark, MD) ke dalam masing-masing tube. Pengerjaan mengikuti prosedur baku kit komersial. Tube MGIT 960 diinokulasi dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C. Perubahan fluoresensi tabung menunjukkan kehadiran bakteri *Mtb* dan pembacaan dilakukan menggunakan MGIT Bactec reader. Untuk uji *spoligotyping* dilanjutkan ke tahap isolasi DNA pada sampel positif dari kultur MGIT Bactec 960 sesuai metode ekstraksi DNA.

C. Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA menggunakan QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) dan prosedur sesuai ketentuan pabrik.⁽⁹⁾ Sejumlah koloni disuspensikan ke dalam 100 µL milliQ eppendorf tube, inkubasi pada 96°C-100°C selama 20 atau 30 menit; lalu dipusingkan pada mikrosentrifuge 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan untuk dicampur dengan PCR mix (Isogen Biosolution minikit) guna amplifikasi DNA.

D. *Spoligotyping*

Pengujian dilakukan menurut prosedur penelitian terdahulu.⁽¹⁴⁾ Sejumlah 50 µL PCR mix mini kit (Isogen Biosolution, BV) yang berisi 4 µl dNTP-mix (2,5 mM dNTP; konsentrasi akhir 0,2 mM dNTP); 5 µl 10x conc. super

Tth buffer; 0,1 µl super *Tth* polymerase (5 unit/µl); 4 µl primer DRa: 5'-GCT TTT GGG TCT GAC GAC-3' berlabel biotin pada ujung 5' (20 pmol); 4 µl primer DRb: 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3' (20 pmol); 5 µL DNA sampel dan MQ *water* secukupnya. Digunakan kontrol negatif 10 µL milliQ serta kontrol positif 10 µL *Mtb* H37Rv dan 10 µL *M.bovis* BCG. Reaksi PCR DNA dilakukan selama 20 putaran dengan pengaturan sebagai berikut: pada suhu 96°C - 3 menit - 1 menit; pada suhu 55°C - 1 menit; dan pada suhu 72°C - 30 detik - 5 menit (Isogen Biosolution, BV). Produk PCR dapat langsung digunakan atau disimpan pada -20°C untuk digunakan kemudian. Pada tabung PCR baru ditambahkan 150 µL buffer 2xSSPE/0,1% SDS (Isogen Biosolution, BV) yang sudah dihangatkan dan 20 µL produk PCR, denaturasi menggunakan *thermocycler* selama 10 menit pada suhu 99,9°C. Kemudian pada mini *blotter* MN45 yang telah diletakkan membran *spoligotyping* kit (IM9702, Isogen Biosolution, BV) berlabel 43 DNA *spacer Mtb* complex segera hibridisasikan DNA hasil PCR. Lakukan hibridisasi selama 1jam pada suhu 60°C. Deteksi menggunakan larutan ECL (Amersham Bioscience, UK) dan kemudian dipaparkan pada *hyper film* (Amersham Bioscience, UK). Interpretasi pola hasil dibuat dalam bentuk lembar Word dan Excel lalu dibandingkan dengan data SPOLDB4 secara manual.

HASIL DAN PEMBAHASAN

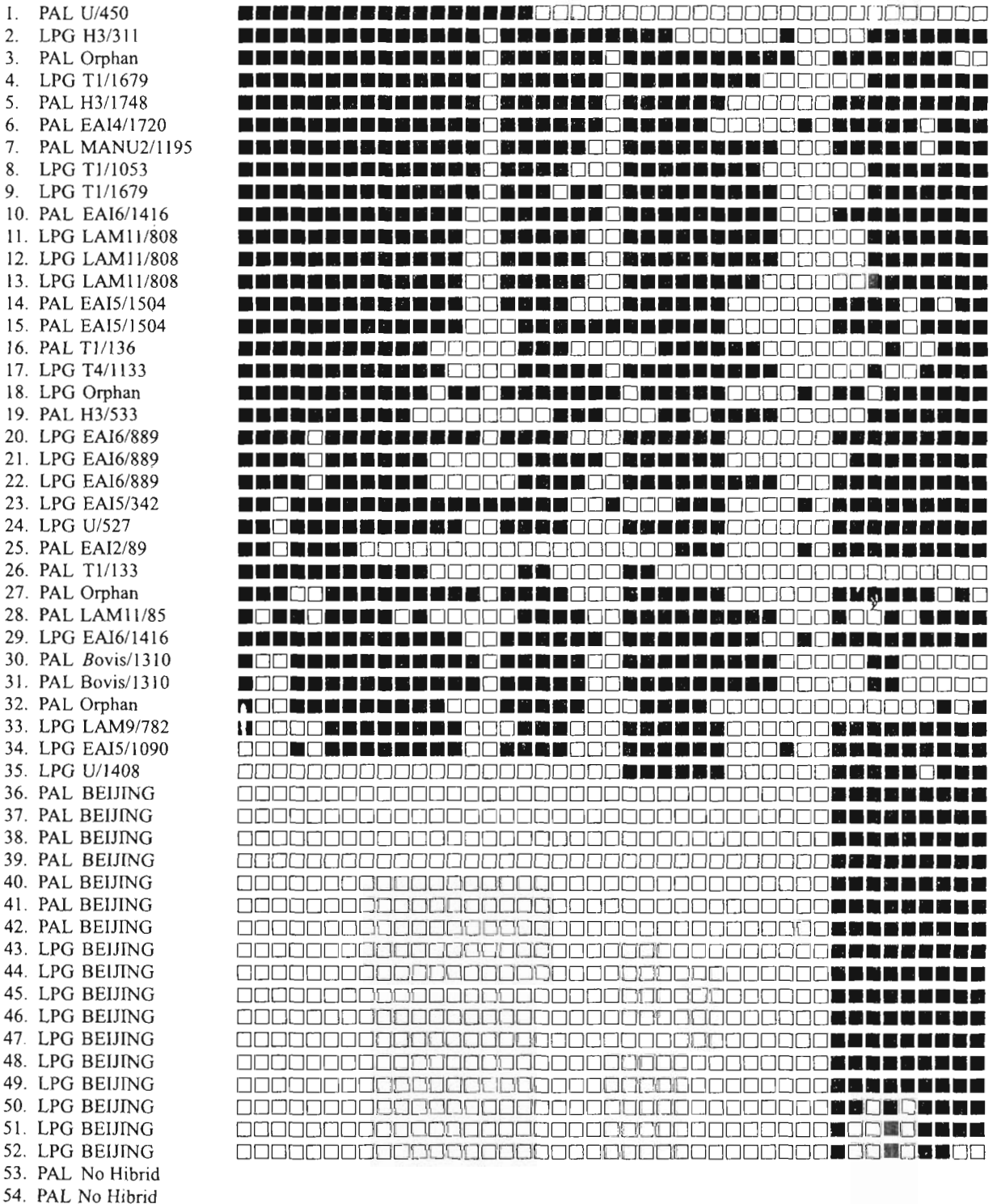
Pada awal penelitian telah direncanakan pengumpulan 300 sample dahak *sps* dari pasien suspek TB yang memiliki *smear* positif (*SS+*) dari 10 kota

lokasi penelitian. Dalam pelaksanaannya, hanya berhasil diinventaris sejumlah 294 sampel yang termasuk ke dalam kriteria inklusi. Empat sampel dikeluarkan karena merupakan pasien anak dengan usia < 15 tahun dan dua sampel lagi karena lembar kuesioner tidak terlampir. Seluruh isolat tersimpan di Laboratorium Bakteriologi Puslitbang BMF.

Dari 294 sampel yang dapat diuji *spoligotyping* sebesar 269 sampel atau 91,50% dari keseluruhan jumlah total. Hal ini disebabkan karena sejumlah sampel pada saat diterima dalam kondisi kering atau terkontaminasi. Faktor penyebab dapat karena kesalahan pengepakan atau lama waktu penyimpanan sebelum sampel terkirim ke BMF. Hal lain adalah karena sampel dahak tidak ditambahkan pengawet. Pada percobaan yang menggunakan media cair MGIT Bactec 960 sebagai media kultur bakteri untuk identifikasi awal *Mtb*, sampel tidak diperbolehkan menggunakan pengawet karena akan merusak media. Dengan tidak menggunakan pengawet kemungkinan terjadinya kontaminasi pada saat transportasi menjadi sangat besar. (Sisa 21 sampel masih terus dikerjakan agar dapat dianalisis lebih lanjut secara *spoligotyping*).

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap kultur positif media cair MGIT Bactec 960 untuk dilihat pola distribusi *Mtb* complex secara *spoligotyping*. Contoh pola *spoligotype* dari kota Palembang dan Bandar Lampung dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada Gambar 1. terlihat adanya tipe *Orphan* pada 1 isolat dan juga 2 isolat memiliki pola spolDB4 menyerupai *M. bovis*. Tipe *orphan* adalah bila pola *spoligo* yang dihasilkan tidak menyerupai pola yang ada di data SPOLDB4 sehingga memiliki kemungkinan merupakan pola sub spesies baru. Juga terdapat 2 isolat tidak menunjukkan pola hibridisasi.



Gambar 1. Pola spoligo dari Isolat DNA Hasil Ekstraksi 54 Sampel Dahak Pasien TB Paru dari Kota Palembang (PAL) dan Lampung (LPG) yang Dibandingkan dengan Data SPOLDB4.

Isolat yang tidak menunjukkan pola hibridisasi menggunakan *probe* yang terdiri dari 43 tipe DNA *spacer* dari Isogen *spoligotyping* kit membutuhkan identifikasi lanjut dengan teknik dan *primer* berbeda, semisal RFLP atau MIRU-VNTR. Konfirmasi perlu dilakukan secara biokimia untuk memastikan isolat tersebut memang termasuk ke dalam golongan *Mtb* dan bukan MOTT (*Mycobacterium Others Than Tuberculosis*) atau NTM (non Tuberculosis Mycobacteria). Adanya sampel yang menunjukkan pola *M. bovis* menunjukkan transmisi infeksi bakteri yang umumnya terdapat pada ternak dapat menyerang wilayah perkotaan, terutama pada golongan ekonomi lemah (pendapatan < Rp. 500.000 per bulan) dengan pekerjaan terkait peternakan atau pertanian.

Data *spoligotype* kemudian dikelompokkan sesuai asal kota di wilayah bagian Indonesia, yaitu: Indonesia Bagian Barat (kota di pulau Sumatra, Jawa dan Kalimantan), Indonesia Bagian Tengah (kota di pulau Sulawesi) dan Indonesia bagian Timur (kota di Maluku) dan disusun di dalam tabel-tabel berikut.

Tabel 1. menunjukkan hasil *spoligotyping* sampel yang berasal dari 2 kota di wilayah pulau Sumatera (Indonesia Bagian Barat), yaitu kota Palembang dan

Bandar Lampung. Pada wilayah ini, dari 59 sampel yang masuk hanya 54 yang berhasil diidentifikasi. Distribusi genotipe galur *W-Beijing* (famili I) menunjukkan nilai sebesar 31,48% (17/54). Jumlah pasien yang terpapar galur *W-Beijing* di kota Bandar Lampung sedikit lebih tinggi dibanding di kota Palembang.

Data *spoligotype* kemudian dianalisis untuk melihat diversitas dan struktur rancang hubungan famili antara sub spesies *Mtb* yang terdapat di kedua kota. Analisis dilakukan terhadap pola *spoligo* pada gambar.1 mengikuti aturan dendrogram sebagaimana pola penelitian terdahulu (Parwati, *et al.*). Hasil analisis di kota Palembang dapat dilihat pada Tabel 2. dan hasil analisis di kota Bandar Lampung pada Tabel 3. Pemisahan tabel dimaksudkan untuk memperjelas perbedaan sub-tipe *Mtb.complex* yang terdapat di ke dua kota.

Pada Tabel 2. terlihat bahwa setelah galur *W-Beijing* maka galur dari *major clades Mtb* lain yang ada di kota Palembang adalah sub-tipe *Undefined/U* (famili H), *the East African-Indian/EAI2* (famili F), H3 (famili *Others*), T1 (famili B-D), EAI5 (famili F), EAI6 (famili F), MANU2 (famili *Others*) dan EAI4 (famili F). Sedangkan pada Tabel 3. menunjukkan *major clades Mtb* yang ada adalah sub-tipe

Tabel 1. Hasil Spoligotyping Spesimen Dahak Pasien TB di Kota Palembang dan Bandar Lampung

	POLA SPOLIGOTYPE												T I	
	Galur <i>W-Beijing</i>	H37 Rv	H Fam	LA M Fa m	EA I Fa m	T Fa m	U Fa m	MAN U Fam	X Fa m	CA S Fa m	<i>M. Bovis</i>	No- Hibri d		Orpha n
Plbg	7	-	2	-	6	2	2	1	-	-	2	2	2	4
Lpg	10	-	1	3	5	4	2	-	-	-	1	-	2	1
Jml	17	-	3	3	11	6	4	1	-	-	3	2	4	5

Keterangan: TI = tidak teridentifikasi karena sample rusak atau terkontaminasi

Tabel 2. Diversitas Spoligotipe dan Struktur Rancang Famili Spoligo di Kota Palembang

Spoligo famili (SPOLDB4)	STRUKTUR RANCANG FAMILI SPOLIGO ¹⁴									
	B	C	D	F	H	I	OTHERS	ISOLAT	POLA	
BEIJING						7		7		1
EAI2				1				1		1
EAI4				1				1		1
EAI5				2				2		2
EAI6				2				2		2
H3							2	2		2
MANU2							1	1		1
Orphan							1	1		1
T1	1	1	1					3		3
U					2			2		2
<i>M.bovis</i>								2		2

Tabel 3. Diversitas Spoligotipe dan Struktur Rancang Famili Spoligo di Kota Bandar Lampung

Spoligo famili (SPOLDB4)	STRUKTUR RANCANG FAMILI SPOLIGO ¹⁴											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	LAIN	ISOLAT	POLA
BEIJING									10		10	1
EAI5						2					2	2
EAI6						3					3	2
LAM9				1							1	1
LAM11				4							4	2
H3	1										1	1
MANU2										1	1	1
Orphan										2	2	2
T1		3									3	2
T4		1									1	1

EAI5 (famili F), the *Latin American and Mediterranean*/LAM9 (famili D), LAM11 (famili D), U (famili G), EAI6 (familia F),

T1 (famili B), H3 (famili A), T4 (famili B), serta terdapat tipe *orphan* pada 2 isolat. Perbedaan setiap pola dari isolat

menunjukkan keberagaman sub-spesies *Mtb* dan umumnya akan memberikan karakteristik yang berbeda pula sebagaimana karakteristik yang khas dari setiap galur. Dari keseluruhan galur yang ada pada sampel di kedua kota ini, jenis galur famili *W-Beijing* (struktur famili I) dan *M.bovis* memiliki kecendrungan resistensi yang cukup tinggi secara teoritis. Hal mana masih membutuhkan pembuktian lebih lanjut dan pengujian akan dilaksanakan pada tahun 2009-2010.

Hasil *spoligotyping* dari 4 kota di wilayah pulau Jawa (Indonesia Bagian Barat), yaitu kota Serang, Jakarta, Bandung dan Surabaya dapat dilihat pada Tabel 4.

Pada wilayah ini, dari 120 sampel yang masuk hanya 111 yang berhasil diidentifikasi. Distribusi genotipe galur *W-Beijing* (famili I) di 4 kota tersebut adalah sebesar 28,83% (32/111). Kota Jakarta dan Bandung memiliki jumlah penderita yang sangat tinggi dibandingkan 2 kota lainnya. Sedangkan di kota Serang hanya 1 sampel yang berhasil diidentifikasi telah terpapar galur *W-Beijing*. Pola distribusi galur

Beijing yang sangat tinggi di 2 kota besar Jakarta dan Bandung dapat menjadi bahan masukan yang berarti bagi program. Ini disebabkan tingginya tingkat mobilitas para pendatang di kedua kota tersebut karena kedua kota berperan strategis dalam jalur perekonomian Nasional. Faktor ini harus dipertimbangkan sebagai salah satu faktor yang dapat menyumbang penyebaran galur *Beijing* di Indonesia. Pola *spoligo* kemudian dianalisis mengikuti aturan dendrogram sebagaimana pola penelitian terdahulu (Parwati, *etal.*) dan hasil terlihat pada Tabel 5.

Pada Tabel 5, uraian galur dari *major clades Mtb* lain yang ada di kota Serang adalah sub-tipe EAI5 (famili F), MANU1 (famili *Others*), U (famili B), EAI1 (famili F) dan EAI2 (famili *Others*). Untuk kota Jakarta, uraian galur yang ada terdapat sub-tipe *the Central and Middle Eastern Asian/CAS1* (famili *Others*), EAI5 (famili F), H3 (famili A), LAM11 (famili *Others*), EAI6 (famili F), T1 (famili B), EAI2 (famili *Others*), U (famili G), MANU2 (famili *Others*), H1 (famili E), LAM10 (famili *Others*), LAM4 (famili

Tabel 4. Hasil Spoligotyping Spesimen Dahak Pasien TB di Kota Serang, Jakarta, Bandung dan Surabaya

	POLA SPOLIGOTYPE												TI	
	Galur <i>W-Beijing</i>	H37 Rv	H Fa m	LA M Fa m	EA I Fa m	T Fa m	U Fa m	MA NU Fam	X Fa m	CA S Fa m	<i>M. Bovis</i>	No-hibrid		Orphan
Srg	1	-	-	-	15	-	10	3	-	-	-	-	-	1
Jkt	11	-	2	3	4	2	2	1	-	1	2	-	2	-
Bdg	14		5	1	3	1	1	-	-	-	-	1	-	4
Sby	6	1	2	6	2	-	1	2	2	-	-	1	3	4
Jml	32	1	9	10	24	3	14	6	2	1	2	2	5	9

Keterangan: TI = tidak teridentifikasi karena sample rusak atau terkontaminasi

Tabel 5. Diversitas *Spoligotipe* dan Struktur Rancang Famili Spoligo di Kota Serang, Jakarta, Bandung dan Surabaya

Spoligo famili (SPOLDB4)	STRUKTUR RANCANG FAMILI SPOLIGO ¹⁴											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	LAIN	ISOLAT	POLA
BEIJING									32		32	2
CAS1										1	1	1
EAI1						5					5	5
EAI2						9					9	4
EAI5						11					11	7
EAI6						2					2	2
LAM1				1							1	1
LAM4										1	1	1
LAM9										1	1	1
LAM10										1	1	1
LAM11										6	6	4
H1					1					1	2	2
H3	1	3									4	4
H4										3	3	2
MANU1										4	4	2
MANU2										2	2	2
Orphan										5	5	5
T1		4	1								5	5
U		10					4				14	9
U (LikelyS)									1		1	1
X1		2									2	2
<i>M.bovis</i>											2	2
H37Rv											1	1

Others) dan terdapat 2 isolat dengan pola *orphan*. Di dalam sampel juga terdapat 2 isolat yang memiliki pola menyerupai *M.bovis* yang secara teoritis resisten terhadap OAT lini I. Di kota Bandung, setelah genotipe galur *W-Beijing* yang men-

capai jumlah 14 isolat maka uraian *major clades Mtb* lain yang ada adalah EAI1 (famili F), EAI2 (famili F), EAI5 (famili F), LAM1 (famili D), H4 (famili *Others*), U (famili G), H3 (famili B) dan H1 (famili E) serta T1 (famili B). Terdapat 1 isolat

yang tidak menunjukkan pola hibridisasi menggunakan *probe* Isogen *spoligotyping* kit sehingga membutuhkan analisis dengan teknik berbeda lebih lanjut apabila secara biokimia termasuk golongan *Mtb*. Hasil spoligo di kota Surabaya menunjukkan sub-tipe EAI5 (famili F), LAM11 (famili *Others*), MANU2 (famili *Others*), UlikeS (famili H), LAM9 (famili D), T1 (famili C), EAI6 (famili F), X1 (famili B), EAI1 (famili F), H37Rv, H3 (famili B), MANU1 (famili *Others*) dan pola *orphan* pada 3 isolat serta 1 isolat tidak menunjukkan pola hibridisasi. Isolat *Mtb* H37Rv merupakan isolat yang masih sensitif terhadap OAT lini I.

Preliminary mapping distribusi *Mtb* di wilayah pulau Jawa menunjukkan bahwa sejumlah isolat berasal dari struktur famili yang sama meski berada di lokasi kota yang berbeda. Hal mana membuktikan bahwa distribusi *Mtb* memiliki pola filogenetik dan filogeografik yang spesifik di setiap daerah.

Hasil *spoligotyping* yang menunjukkan distribusi galur *W-Beijing* di dua kota di wilayah pulau Kalimantan,

yaitu Banjarmasin dan Pontianak (Indonesia Bagian Barat) sebesar 16,98% (9/53) dapat dilihat pada Tabel 6. Dari 57 sampel yang masuk, hanya 53 sampel berhasil diidentifikasi. Populasi sampel yang terpapar menunjukkan jumlah yang hampir sama di dua kota tersebut. Uraian secara aturan dendrogram mengikuti penelitian terdahulu⁽¹⁴⁾, menunjukkan bahwa galur dari *major clades Mtb* yang ada di kota Banjarmasin selain galur *W-Beijing* adalah sub-tipe H3 (famili A) ada 1 pola, EAI5 (famili F) ada 3 pola (4 isolat), U (famili G) ada 2 pola, H1 (famili E) ada 1 pola, CAS1 (famili *Others*) ada 1 pola, LAM11 (famili D) ada 1 pola, LAM7 (famili *Others*) ada 1 pola, EAI2 (famili F) ada 2 pola, LAM1 (famili D) ada 1 pola, LAM8 (famili D) ada 1 pola, MANU2 (famili *Others*) ada 1 pola, LAM9 (famili D) ada 2 pola (3 isolat), X1 (famili *Others*) ada 1 pola, EAI1 (famili F) ada 1 pola, T1 (famili E) ada 1 pola, dan 3 isolat menunjukkan pola *orphan* serta 1 isolat tidak menunjukkan pola hibridisasi di lembar membran. Di kota Pontianak, ditemukan galur dari sub-tipe T1 (famili B) ada 3 pola (4 isolat), EAI5 (famili F) ada 3

Tabel 6. Hasil Spoligotyping Spesimen Dahak Pasien TB di Kota Banjarmasin dan Pontianak

	POLA SPOLIGOTYPE												TI	
	Galur	H37	H	LA	EA	T	U	MA	X	CA	M.	No-		Orph
<i>W-Beijing</i>	Rv	Fa	M	I	Fa	Fa	NU	Fa	S	<i>Bovis</i>	hibri	an		
		m	Fa	Fa	m	m	Fam	m	Fa	m	d			
Bjm	4	-	2	6	7	1	2	1	1	1	-	1	3	1
Ptnk	5	-	-	1	11	4	1	-	2	-	-	-	-	3
Jml	9	-	2	7	18	5	3	1	3	1	-	1	3	4

Keterangan: TI = tidak teridentifikasi karena sample rusak atau terkontaminasi

pola (4 isolat), EAI2 (famili *Others*) ada 2 pola, X1 (famili *Others*) ada 2 isolat, EAI6 (famili) ada 2 pola (3 isolat), LAM11 (famili *Others*) ada 1 pola dan U (famili G) ada 1 pola.

Keseluruhan nilai paparan galur *W-Beijing* di 8 kota lokasi penelitian yang berada di wilayah Indonesia Bagian Barat (Sumatra, Jawa dan Kalimantan) adalah sebesar 26,61% (58/218). Galur *Mtb compl.* yang juga menjadi mayoritas di daerah Barat Indonesia adalah *Mtb* famili EAI dengan persentase sebesar 21,56% (47/218), diikuti oleh *Mtb* famili LAM sebesar 9,17% (20/218), famili T sebesar 6,88% (15/218) dan famili H sebesar 6,42% (14/218). Di kota Surabaya bahkan ditemukan isolat *Mtb* H37Rv. Pada umumnya berdasarkan literatur, *Mtb* dari keempat famili ini masih sensitif terhadap OAT lini pertama. Dari data yang diperoleh, tidak menutup kemungkinan satu responden memiliki multi galur di dalam tubuhnya yang masih perlu diteliti lebih lanjut. Oleh karena itu, kemungkinan terjadinya resistensi OAT tetap membutuhkan pembuktian menggunakan uji suseptibilitas dari kultur spesimen pasien. Terutama isolat yang mengandung bakteri *M.bovis*.

Tabel 1 - Tabel 6. di atas juga menunjukkan adanya 11 sampel yang memiliki pola *orphan* dari keseluruhan sampel di wilayah Indonesia Barat. Pola yang tidak menyerupai pola yang sudah terdapat di spolDB4 ini masih harus dikonfirmasi lebih lanjut sebagaimana hasil analisis yang lain untuk memastikan apakah isolat yang ada memang memiliki pola yang berbeda dengan yang sudah ada di *gene bank* SPOLDB4 atau tidak.

Hasil *spoligotyping* di wilayah Makassar (Indonesia Bagian Tengah) menunjukkan persentase galur *W-Beijing* cukup tinggi, yaitu sebesar 25,93% (7/27). Sementara di wilayah kota Ambon (Indonesia Bagian Timur), hasil *spoligotyping* menunjukkan tidak ditemukannya galur *W-Beijing*. Dari 30 sampel yang masuk di kota Makassar hanya 27 yang berhasil diidentifikasi sementara dari 28 sampel yang masuk di kota Ambon hanya 24 sampel berhasil diidentifikasi. Data hasil *spoligotyping* dapat dilihat pada Tabel 7. Perlu diingat, pada penelitian ini faktor jumlah sampel yang terbatas juga dapat menjadi bahan pertimbangan terhadap hasil akhir. Hal mana menyebabkan masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut

Tabel 7. Hasil Spoligotyping Spesimen Dahak Pasien TB di Kota Makassar dan Ambon

	POLA SPOLIGOTYPE											TI		
	Galur <i>W-Beijing</i>	H37Rv	H Fam	LA M Fa m	EA I Fa m	T Fa m	U Fa m	MAN U Fam	X Fa m	CA S Fa m	<i>M. Bovis</i>		No-hibrid	Orphan
Mksr	7	-	3	3	5	-	4	1	-	-	1	-	3	3
Ambon	-	-	2	5	8	7	1	-	-	-	-	1	-	4
Jml	7	-	5	8	13	7	5	1	-	-	1	1	3	7

Keterangan: TI = tidak teridentifikasi karena sample rusak atau terkontaminasi

dengan jumlah sampel yang lebih memadai akurat. guna memperoleh konfirmasi hasil yang lebih

Galur dari *major clades Mtb* lain yang ada di kota Makassar selain galur *W-Beijing* adalah sub-tipe EAI1 (famili F) ada 1 pola, H1 (famili E) ada 1 pola, LAM11 (famili *Others*) ada 2 pola (5 isolat), EAI2 (famili *Others*) ada 2 pola, U (famili G) ada 3 pola, UlikeS (famili H) ada 1 pola, EAI5 (famili F) ada 1 pola, Ulikely LAM (famili *Others*) ada 1 pola, MANU2 (famili *Others*) ada 1 pola dan H3 (famili A) ada 2 pola. Di dalam sampel juga terdapat 1 isolat menunjukkan pola *M.bovis*. Tipe *Mtb* sub-spesies famili EAI, U, LAM dan H mendominasi pola distribusi *Mtb* complex. Hasil dari kota Makasar pada penelitian ini digunakan sebagai pola distribusi *Mtb* di wilayah Indonesia Tengah. Menjadi perhatian adalah terdapat 3 sampel memiliki pola tipe *orphan* yang membutuhkan analisis lebih lanjut.

Hasil *spoligotyping* di kota Ambon (Indonesia Bagian Timur) menunjukkan tidak terdapat galur *W-Beijing*. Pola distribusi *Mtb* complex yang dominan adalah dari galur *Mtb* famili EAI (famili F) ada 5 pola (8 isolat), LAM1 (famili D) ada 1 pola (5 isolat), H3 (famili A) ada 2 pola (2

isolat), T1 (famili C) ada 2 pola (7 isolat), dan U (famili G) ada 1 pola. Dalam sampel juga ditemukan 1 isolat tidak menunjukkan pola hibridisasi. Kecilnya distribusi galur *W-Beijing* di daerah Indonesia Timur sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya,⁽¹⁴⁾ tetapi masih membutuhkan konfirmasi lebih lanjut untuk dikaitkan dengan faktor *phylogenetic*.

Seluruh data kemudian dianalisis secara statistik *chi square* menggunakan program SPSS15,0. Analisis ditujukan untuk melihat apakah terdapat hubungan yang signifikan antara genotipe sampel dengan gender, etnis dan peta geografis /kota responden. Hasil analisis pada Tabel 8. menunjukkan bahwa tidak terlihat hubungan yang signifikan antara data genotipe dengan gender ($p = 0,09$) pada sampel penelitian. Jadi untuk terkena TB Paru antara pria dan wanita memiliki kemungkinan yang sama. Hubungan yang signifikan baru terlihat antara kelompok genotipe dengan peta geografis ($p = 0,015$) seperti terlihat pada Tabel 9. yang menguatkan teori sinergisme faktor filogenetik dan faktor filogeografik pada distribusi *Mtb*. Hubungan yang signifikan juga terlihat antara kelompok genotipe dengan etnis ($p= 0,00$) pada Tabel 10

Tabel 8. Hasil Analisis hubungan antara Jenis Kelamin dengan Kelompok Genotipe

	KELOMPOK GENOTIPE			TOTAL
	BEIJING	Non Beijing	ORPHAN	
PRIA	43 (24,2%)	135 (75,8%)	0	178 (100%)
WANITA	18 (15,3%)	99 (83,9%)	1 (0,8%)	118 (100%)
TOTAL	61 (20,6%)	234 (79,1%)	1 (0,3%)	296 (100%)

Tabel 9. Hasil Analisis hubungan antara Kelompok Wilayah dengan Kelompok Genotipe

WILAYAH INDONESIA	KELOMPOK GENOTIPE		TOTAL
	BEIJING	Non Beijing	
INDONESIA BARAT	43 (23,1%)	143 (76,9%)	186 (100%)
INDONESIA TENGAH	7 (23,3%)	23 (76,7%)	30 (100%)
INDONESIA TIMUR	-	29 (100,0%)	29 (100%)

Pengaruh faktor geografis yang terkait pohon filogenetik *Mtb* menunjukkan cabang homolog dari beberapa sub tipe *Mtb* yang mayoritas terdapat di wilayah Afrika, Asia dan di wilayah keduanya.⁽¹⁷⁾ Informasi pohon filogenetik juga menggambarkan kombinasi alele spesifik yang dapat menjadi penanda pada uji konfirmasi MIRU-VNTR ataupun bila akan menggunakan metode RFLP. Kesimpulan

Hasil *preliminary mapping* bagian I yang dilakukan terhadap sejumlah sampel dahak pasien TB yang diambil dari 10 kota di wilayah Indonesia Barat, Tengah dan Timur menunjukkan tingginya diversitas penyebaran subspecies *Mtb* complex berdasarkan data di spoligogenotipe (spolDB4). Bagian Barat dan Tengah Indonesia menunjukkan tingkat suseptibilitas untuk terkena paparan galur *W-Beijing* lebih tinggi dibanding dengan pasien di wilayah Indonesia Timur. Analisis pola SpolDB4 juga menunjukkan mayoritas isolat termasuk kedalam *major clades* dari *M.tuberculosis*, yaitu famili LAM, EAI, H dan T. Terdapat 5 isolat yang menunjukkan pola *M.bovis* dan sejumlah isolat memiliki pola *Orphan* yaitu pola *spoligotype* yang berbeda dengan yang terdapat pada data spolDB4. Ada kemungkinan isolat yang memiliki pola *Orphan* adalah subspecies baru yang

memiliki karakteristik tersendiri dan membutuhkan penelitian lebih lanjut.

Distribusi *Mtb* melihat pola yang diberikan mencakup asal pergerakan bakteri mulai dari Asia Tengah, India, Asia Timur, daratan Eropa sampai dari Afrika. Apakah kemudian karakteristik yang dimiliki oleh bakteri tersebut masih menyerupai asalnya atau sudah mengalami perubahan masih membutuhkan penelitian lebih lanjut. Keseluruhan data dapat digunakan sebagai bahan uji banding program tata laksana TB antar negara.

Pola distribusi *Mtb* complex di Indonesia sesuai hasil *preliminary mapping* pada penelitian ini dapat juga digunakan sebagai suatu deteksi dini dalam persiapan program penanggulangan MDR/XDR-TB di wilayah Indonesia. Terutama bila fokus pada distribusi galur *W-Beijing* seperti telah dinyatakan di atas merupakan galur dengan virulensi dan kecenderungan alamiah untuk menimbulkan resistensi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Keseluruhan penelitian dibiayai oleh dana DIPA 2008 Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI. Secara khusus, ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Dr. Endang R. Sedyaningsih, MPH, Dr. PH., selaku Koordinator Penelitian

Tabel 10. Hasil Analisis Hubungan antara Kelompok Kota dengan Kelompok Genotype *W-Beijing*, *Beijing* dan *Orphan /no hibridazion*

suku	<i>Not identified</i>	kel_genotipe Beijing			Total 1
		Beijing	Non- Beijing	Orphan/No hybrid	
	Count	12	51	0	63
	% within suku	19,0%	81,0%	,0%	100,0%
Ambon	Count	0	10	0	10
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Bali	Count	0	1	0	1
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Banjar	Count	4	12	0	16
	% within suku	25,0%	75,0%	,0%	100,0%
Banten	Count	0	1	0	1
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Batak	Count	0	1	0	1
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Betawi	Count	2	13	0	15
	% within suku	13,3%	86,7%	,0%	100,0%
Bugis	Count	4	22	0	26
	% within suku	15,4%	84,6%	,0%	100,0%
Cina	Count	0	1	1	2
	% within suku	,0%	50,0%	50,0%	100,0%
Dayak	Count	0	2	0	2
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Jateng	Count	0	2	0	2
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Jawa	Count	14	60	0	74
	% within suku	18,9%	81,1%	,0%	100,0%
Lampung	Count	3	3	0	6
	% within suku	50,0%	50,0%	,0%	100,0%
Madura	Count	2	6	0	8
	% within suku	25,0%	75,0%	,0%	100,0%
mal-teng	Count	0	1	0	1
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Maluku	Count	0	9	0	9
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
mal-ut	Count	0	1	0	1
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Mandar	Count	0	1	0	1
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Melayu	Count	2	9	0	11
	% within suku	18,2%	81,8%	,0%	100,0%
Padang	Count	2	2	0	4
	% within suku	50,0%	50,0%	,0%	100,0%
palembang	Count	1	3	0	4
	% within suku	25,0%	75,0%	,0%	100,0%
Sulsel	Count	0	2	0	2
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
sul-teng	Count	0	2	0	2
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Sulteng	Count	0	3	0	3
	% within suku	,0%	100,0%	,0%	100,0%
Sunda	Count	15	16	0	31
	% within suku	48,4%	51,6%	,0%	100,0%
Total	Count	61	234	1	296
	% within suku	20,6%	79,1%	,3%	100,0%

Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Mtb* di Puslitbang BMF tahun 2008. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada dr. Triono Soendoro, Ph.D. dan Dr.dr. Trihono, MSc selaku konsultan dalam penelitian TB 2008. Kami juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Drs. Syahrial Harun, MSc. dan seluruh anggota Tim Penelitian 2008, para peneliti dan para pembantu peneliti beserta staf administrasi penelitian. Terimakasih juga kami sampaikan kepada seluruh pihak yang telah menyumbangkan segala bantuan moril dan materil untuk terlaksananya penelitian ini

DAFTAR RUJUKAN

1. WHO Report. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. 2006.
2. Subdit TB. Laporan Akhir Tahun. Ditjen. Pemberantasan Penyakit Menular – Penyehatan Lingkungan (P2MPL), Depkes RI. Jakarta. 2007.
3. WHO Report. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. 2009.
4. USAID. Overview of Indonesia. 2009.
5. Badan Litbangkes. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) Nasional 2007. Balitbangkes, Depkes RI. Jakarta 2007.
6. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. Medical Microbiology: Mycobacterium. Fifth ed. Elsevier MOSBY. Philadelphia USA. 2005 ; 297-310.
7. Nester, EW., Anderson, DG., Roberts, CE., Nester, MT. Microbiology: A Human Perspective. Fifth ed., Mc. Graw Hill. New York. USA. 2007 ; 245-264.
8. Mandell, GL., Bennet, JE., Dolin, R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Sixth ed., Elsevier Churchill Livingstone. Philadelphia. USA. 2005 ; 184-228.
9. Van der Zanden, A. Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis. Thesis. Medical Microbiology and Infectious Disease, location Lukas, Gelre Hospitals, Apeldoorn, Bilthoven, The Netherlands 2002.
10. Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2002 ; .99:3684-3689.
11. Gori A, Bandera A, Marchetti G, Esposti AD, Catozzi L, Nardi GP. Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no08/04-0982.htm>. 2005
12. Chimara, E., Ferrazoli, L., Leao, SC. Mycobacterium tuberculosis Complex Differentiation Using gyrB Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.2004 ; 7: 745-748.
13. Glynn , JR., Crampin, AC., Traore,, H., Yates, MD., Mwaungulu, FD., Ngwira , BM., Chaguluka, SD., Mwafuilirwa, DT., Floyd,, S., Murphy, C., Drobniewski,, FA., Fine, PEM. 2005. Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype, Northern Malawi. EID Journal.at <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no01/04-0869.htm>.
14. Parwati, I., Crevel, R., Sudiro, M., Alisjahbana, A., Pakasi, T., Kremer, K., Zanden, A., Soolingen, D. Mycobacterium tuberculosis Population Structure Differs Significantly on Two Indonesian Islands. J. Clin. Microbiology. 2008 : 46: 3639 – 3645
15. Klingerren, B., Dessens-Kroon, M., Laan, T., Kremer, K., Soolingen, D. Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis Complex by Use of a High-Throughput, Reproducible, Absolute Concentration Method. J. Clin. Microbiology. 2007:45: 2662-2668.
16. Tsi-Shu, H., Calvin M.K, Lee, S.S., Yao-Shen Chen, Tu, HZ and Liu, Y. 2005. Trends in Fluoroquinolone Resistance of Mycobacterium tuberculosis complex in a Taiwanese Medical Centre: 1995–2003. J. of Antimicrobial Chemotherapy. 56: 1058-1062.
17. Sola,C., Filliol, I., Gutierrez, MC., Mokrousov, I., Vincent, V., Rastogi, N. Spoligotype Database of Mycobacterium tuberculosis: Biogeographic Distribution of

- Shared Types and Epidemiologic and Phylogenetic Perspectives. *Emerging Infectious Disease Journal* 2001 : 7: 390-396.
18. Al-Hajoj, S.A.M., Zozio, T., Al-Rabiah, F., Mohammad, V., Al-Nasser, M., Sola, C., Rastogi, N. First Insight into the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. *J. Clin. Microbiology* 2007: 45: 2467-2473.
 19. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Martin C, et al.. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2607-18.
 20. Marchetti G, Gori A, Catozzi L, Rossi MC, Moroni M, Franzetti F. Comparison of spoligotyping vs RFLP DNA fingerprinting analysis in *M. tuberculosis* epidemiological typing. Program Abstr 4th Conf Retrovir Oppor Infect Conf Retrovir Oppor Infect 4th 1997 Wash D C. Jan 22-26; 4th: 184 (abstract no. 645).
 21. Bergmann, J.S., et al. Clinical Evaluation of the Roche AMPLICOR PCR *Mycobacterium tuberculosis* Test for Detection of *M. tuberculosis* in Respiratory Specimens. *J. Clin. Mikrobiology* 1996 : 34: 1083 – 1085.
 22. Parwati, I. Spoligotyping. Makalah Presentasi pada Diskusi Ilmiah Berkala Pokja DIB - Panitia Pembina Ilmiah (PPI) Puslitbang Biomedis dan Farmasi (BMF). Bagian Patologi Klinik RS. Hasan Sadikin. Bandung 2008.