

**OPTIMASI VARIASI KONSENTRASI AGAROSE DAN WAKTU  
ELEKTROFORESIS TERHADAP KUALITAS PITA DNA  
*Mycobacterium tuberculosis* RESISTAN ISONIAZID**

*Optimization Of Agarose Concentration Variation and Electrophoresis Time On  
The Quality Of DNA Bands Of Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis*

**Ina Siti Halimah<sup>1\*</sup>, Mohamad Firman Solihat<sup>2</sup>, Ai Djuminar<sup>3</sup>,  
Zuri Rismiati<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes Bandung,  
Email: [inagingin015@gmail.com](mailto:inagingin015@gmail.com)

**ABSTRACT**

**Bakcground** This study aimed to determine the optimal concentration and duration of agarose gel electrophoresis for detecting *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) resistant to isoniazid (INH) using primers specific to detect mutations in the *katG* gene at codons 315 and 463. The length of the PCR product varied for different mutations: 101 bp (S315T), 141 bp (S315N), 200 bp (S315I), 247 bp (S315R), 290 bp (S315G), and 400 bp (R463L). The experiment compared agarose concentrations of 1%, 1.5%, and 2% with electrophoresis durations of 30, 45, and 60 minutes. Gel images were analyzed using ImageJ software. The samples used in this study were DNA extracts from INH-resistant MTB obtained from real-time PCR. The results showed that optimal DNA bands for the *katG* gene mutations at codon 315 (101 bp, 141 bp, 200 bp, and 290 bp) were obtained at a 2% agarose concentration with a 45-minute electrophoresis duration. For the *katG* gene mutations at codon 315 (247 bp) and codon 463 (400 bp), the optimal conditions were a 2% agarose concentration with a 60-minute electrophoresis duration.

**Keywords:** Electrophoresis, Agarose Concentration, Electrophoresis Time, *Mycobacterium tuberculosis*, Isoniazid (INH)

## ABSTRAK

**Latar Belakang** *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid (INH) terjadi akibat mutasi gen dimana sebagian besar terjadi pada gen katG. Pada penelitian ini digunakan sampel dengan primer untuk mendeteksi mutasi gen katG untuk MRD TB pada kodon 315 dan 463 dengan panjang produk primer yang bervariasi diantaranya 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi dan lama waktu elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid (INH) pada gel agarose yang optimum. Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen mengenai perbandingan variasi konsentrasi agarose 1%, 1,5% dan 2% terhadap variasi lama waktu elektroforesis pada 30 menit, 45 menit dan 60 menit. Analisa pita DNA hasil elektroforesis menggunakan aplikasi *imageJ*. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah pull DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid hasil produk *real time* PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid (INH) gen katG untuk MRD TB pada kodon 315 dengan ukuran produk 101 bp S315T, 141 bp S315N, 200 bp S315I, dan 290 bp S315G diperoleh optimal pada konsentrasi agarose 2% dan waktu elektroforesis selama 45 menit. Pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid (INH) gen katG untuk MRD TB pada kodon 315 dengan ukuran produk 247 bp S315R dan gen katG untuk MRD TB pada kodon 463, ukuran 400 bp R463L optimal pada konsentrasi agarose 2% dengan waktu elektroforesis selama 60 menit.

**Kata Kunci** : *Mycobacterium tuberculosis*, Isoniazid (INH), Elektroforesis, Konsentrasi agarose, Waktu elektroforesis

## PENDAHULUAN

Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 13 tahun 2013 menyatakan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* resisten obat merujuk kepada situasi di mana bakteri *Mycobacterium tuberculosis* tidak dapat dibunuh dengan obat anti tuberkulosis (OAT) standar. Mengelola Tuberkulosis (TB) yang tahan terhadap OAT jauh lebih kompleks dibandingkan dengan TB biasa karena resistansi ini disebabkan oleh mutasi spontan pada kromosom *Mycobacterium tuberculosis*, bakteri penyebab TB.<sup>1,2</sup>

Terdapat beberapa bentuk resistansi terhadap OAT, salah satunya adalah Multi Drug Resistant (MDR), yang artinya resisten terhadap isoniazid dan rifampisin, baik dengan atau tanpa resistensi terhadap obat lini pertama lainnya. Sementara *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap salah satu OAT, misalnya resisten terhadap rifampisin atau isoniazid (H), disebut sebagai monoresistensi.<sup>2</sup>

Sejak tahun 2010, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) merekomendasikan penggunaan alat Xpert MTB/RIF sebagai tes awal untuk mendiagnosis TB RO dan TB pada pasien HIV. Tes Xpert MTB/RIF menggunakan teknologi Nucleic Acid Amplification Technology (NAAT) yang memungkinkan diagnosis TB dan resistensi terhadap Rifampisin dalam waktu 2 jam.<sup>3</sup>

Tes molekuler cepat (TMC) adalah sebuah metode pemeriksaan yang secara bersamaan dapat mengidentifikasi keberadaan resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap rifampisin. Dengan diagnosis yang akurat, terapi dapat segera diinisiasi untuk mengurangi insiden TB secara keseluruhan. Hasil penelitian dalam skala besar menunjukkan bahwa TMC memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang jauh lebih baik dalam mendiagnosis TB jika dibandingkan

dengan pemeriksaan mikroskopis. Namun, keterbatasan utama dari metode TMC ini adalah kemampuannya yang terbatas hanya untuk mendeteksi resistensi terhadap rifampisin.<sup>4</sup>

Metode lain untuk pemeriksaan TB yaitu dengan *Real time* PCR (qPCR). Temuan penelitian menunjukkan bahwa persentase hasil positif pemeriksaan *Mycobacterium tuberculosis* secara mikroskopis, kultur, dan qPCR berturut-turut adalah 37%, 44%, dan 46%. Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* melalui qPCR menunjukkan sensitivitas 100% dan spesifisitas 96,5% jika dibandingkan dengan metode kultur. Metode qPCR juga mampu mendeteksi resistensi isoniazid dan rifampisin pada *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>5</sup>

Isoniazid (INH) adalah obat anti-tuberkulosis lini pertama yang sangat efektif melawan *Mycobacterium tuberculosis*. INH masuk ke dalam sel *Mycobacterium tuberculosis* sebagai prodrug dan kemudian diaktivasi oleh enzim katalase peroksidase yang diekspresikan oleh gen *katG* dari *Mycobacterium tuberculosis* menjadi bentuk aktifnya. INH aktif kemudian menghambat biosintesis asam mikolik, yang merupakan asam lemak  $\beta$ -hidroksilasi bercabang  $\alpha$  berantai panjang di dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>6,4</sup>

Berdasarkan data penelitian, resistansi terhadap isoniazid terjadi akibat mutasi gen *Mycobacterium tuberculosis* pada salah satu atau beberapa gen, seperti *katG*, *kasA*, *oxyR*, *ahpc*, *furA*, *iniA*, *iniB*, *iniC*, *ndh*, dan *inhA* merupakan penyebab resistansi terhadap INH. Frekuensi mutasi gen lebih tinggi pada gen *katG* (50-95%) dan gen *inhA* (8-43%), sedangkan mutasi pada gen lain terjadi pada frekuensi yang lebih rendah.<sup>7,8</sup> Hasil penelitian Aurelia pada tahun 2023 telah meneliti 6 pasang primer dan probe untuk deteksi *katG* untuk MDR TB pada kodon 315 dan 463 secara *in silico* ditemukan

primer untuk mengidentifikasi mutasi pada gen *katG* terjadi dengan panjang produk primer yang bervariasi diantaranya 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L). Namun penelitian ini belum dibuktikan secara laboratorium, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dilakukan optimasi pada *real time* PCR (qPCR) dan optimasi pada Elektroforesis.<sup>9</sup>

## METODE

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian kuasi eksperimental pada optimasi konsentrasi gel *agarose* serta lamanya waktu elektroforesis. Desain penelitian ini dibuat dengan variasi konsentrasi *Gel agarose* dan lama waktu elektroforesis dengan kualitas pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid dari hasil qPCR.

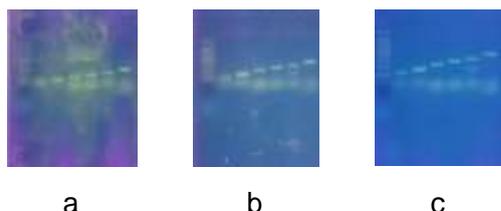
Penelitian ini sudah dinyatakan layak etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung dengan nomor layak etik No. 55/KEPK/EC/XII/2023

## HASIL

Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian yang diawali dengan penemuan Literatur penggunaan primer baru untuk deteksi mutasi yang terjadi pada gen *katG* kodon 315 dan 463 secara *in silico*. Namun penelitian ini belum dibuktikan secara laboratorium, sehingga dilakukan penelitian lebih lanjut. Rangkaian penelitian lanjutan dilakukan dengan optimasi pada *real time* PCR (qPCR) dan optimasi secara elektroforesis pada gel *agarose* terhadap variasi konsentrasi dan lama waktu elektroforesis. Variasi konsentrasi *agarose* adalah konsentrasi (b/v) 1%, 1,5% dan 2% dengan variasi lama waktu elektroforesis selama 30 menit, 45 menit dan 60 menit. Pengamatan hasil elektroforesis dilakukan perendaman dengan menggunakan pewarna *Diamond Nucleic Acid Dye* dengan lama

perendaman yaitu 30 menit.<sup>10</sup> Pita DNA yang terbentuk kemudian dianalisis ukurannya dengan dibandingkan terhadap *ladder* dan untuk penentuan luas area pita DNA dianalisa menggunakan aplikasi *ImageJ*.<sup>11</sup>

### Hasil Elektroforesis Dengan Variasi Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Pada Waktu 30 Menit



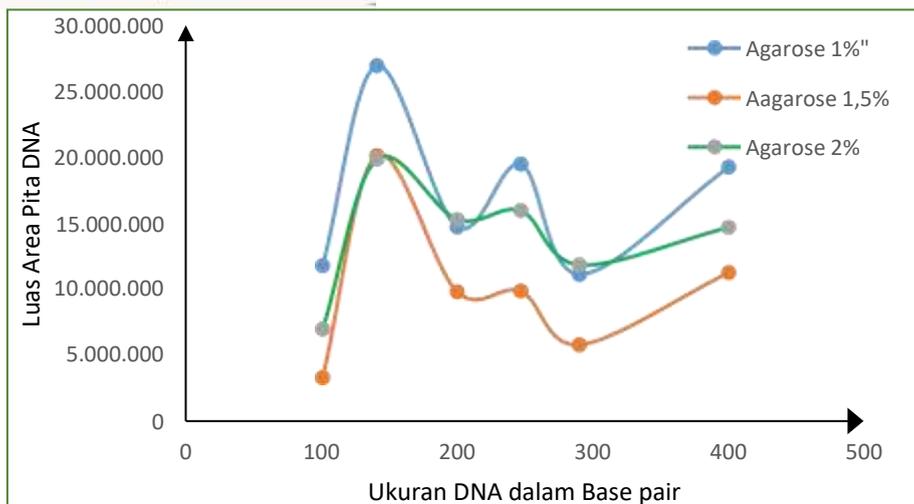
**Gambar 1.1** Perbandingan Visualisasi Hasil Elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* Resistan Isoniazid pada Konsentrasi Agarose (a) 1%, (b) 1,5% dan (c) 2% dengan Lama Waktu Elektroforesis 30 Menit

Pada Gambar 1.1 menunjukkan visualisasi hasil elektroforesis

*Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid pada konsentrasi agarose bervariasi mulai dari 1%, 1,5% dan 2% dengan lama waktu elektroforesis sama yaitu 30 menit. Pada penelitian ini digunakan *ladder* berukuran 100 bp, terlihat pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid dengan ukuran pasang basa yang bervariasi. Proses elektroforesis dengan lama waktu elektroforesis 30 menit memberikan pemisahan fragmen DNA marker cukup baik, dimana marker sudah terpisah menjadi 11 pita DNA namun jarak antar pita DNA *ladder* masih rapat, selanjutnya dilakukan kuantifikasi ketebalan pita DNA menggunakan aplikasi *imageJ*. Hasil pengukuran luas area pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan Isoniazid menggunakan aplikasi *imageJ* pada konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% dengan lama waktu elektroforesis 30 menit seperti pada tabel 1.1

**Tabel 1.1** Hasil Pengukuran Luasa Area Pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* Resistan Isoniazid Pada Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 30 Menit

| DNA Target | Luas Area Pita DNA      |            |            |
|------------|-------------------------|------------|------------|
|            | Konsentrasi Gel Agarose |            |            |
|            | 1%                      | 1,5%       | 2%         |
| S315T      | 11.792.522              | 3.326.811  | 6.988.903  |
| S315N      | 26.920.898              | 20.124.693 | 19.864.752 |
| S315I      | 14.720.149              | 9.809.711  | 15.290.095 |
| S315R      | 19.481.371              | 9.875.933  | 15.963.530 |
| S315G      | 11.134.045              | 5.804.740  | 11.848.874 |
| R463L      | 19.253.610              | 11.267.983 | 14.693.995 |

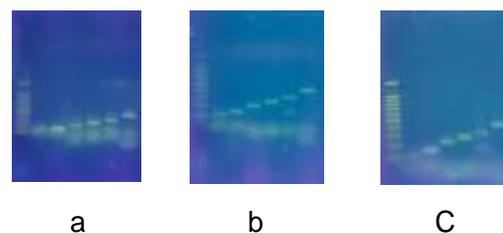


**Gambar 1.2** Grafik Gambaran Luas Area Pita DNA dengan Ukuran DNA dalam Base Pair pada Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% dengan Lama Waktu Elektroforesis 30 Menit

Pada tabel 1.1 dan gambar 1.2 diperoleh ketebalan pita pada masing-masing DNA target pada variasi konsentrasi agarose 1%, 1,5% dan 2% dengan lama waktu elektroforesis 30 menit yang diukur menggunakan aplikasi *ImageJ*. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 101 bp (untuk mutasi S315T) paling baik diperoleh pada konsentrasi agarose 1% yaitu 11.792.522. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 141 bp (mutasi S315N) paling baik diperoleh pada konsentrasi agarose 1% yaitu 26.920.898. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 200 bp (mutasi S315I) paling baik diperoleh pada konsentrasi agarose 2% yaitu 15.290.095. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 247 bp (mutasi S315R) paling baik diperoleh pada konsentrasi agarose 1% yaitu 19.481.371. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 290 bp (mutasi S315G) paling baik

diperoleh pada konsentrasi agarose 2% yaitu 11.848.874. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 463 dengan ukuran 400 bp (mutasi R463L) paling baik diperoleh pada konsentrasi agarose 1% yaitu 19.253.610.

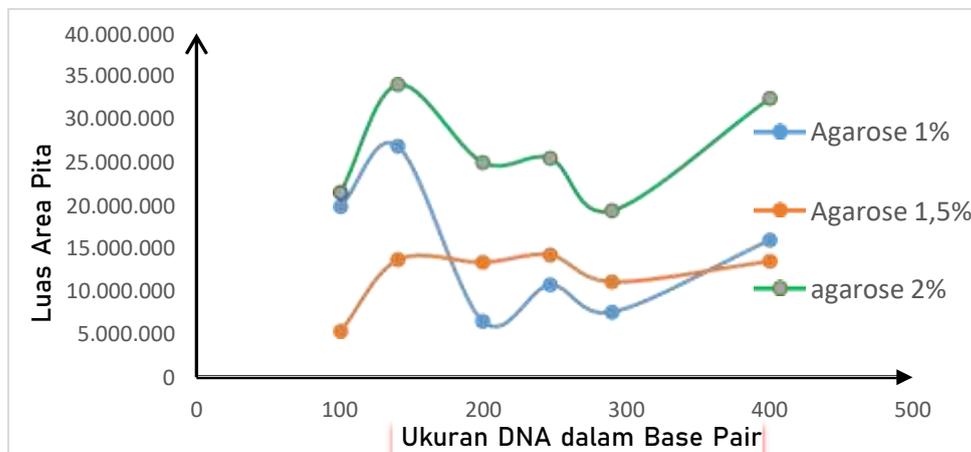
**Hasil Elektroforesis Dengan Variasi Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Pada Waktu 45 Menit**



**Gambar 1.3** Perbandingan Visualisasi Hasil Elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* Resistan Isoniazid pada Konsentrasi Agarose (a) 1%, (b) 1,5% dan (c) 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 45 Menit

**Tabel 1.2 Hasil Pengukuran Luasa Area Pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* Resistan Isoniazid Pada Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 45 Menit**

| DNA Target | Luas Area Pita DNA      |            |            |
|------------|-------------------------|------------|------------|
|            | Konsentrasi Gel Agarose |            |            |
|            | 1%                      | 1,5%       | 2%         |
| S315T      | 19.815.969              | 5.384.217  | 21.446.714 |
| S315N      | 26.802.032              | 13.671.685 | 33.939.505 |
| S315I      | 6.536.078               | 13.375.563 | 24.922.614 |
| S315R      | 10.768.723              | 14.224.652 | 25.413.664 |
| S315G      | 7.595.217               | 11.106.267 | 19.346.442 |
| R463L      | 15.942.936              | 13.490.924 | 32.350.392 |

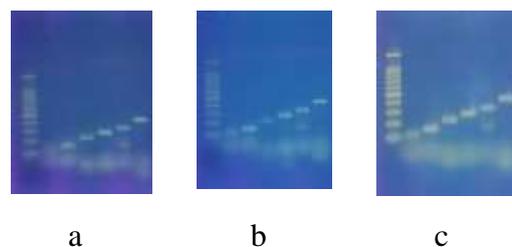


**Gambar 1.4 Grafik Gambaran Luas Area Pita DNA dengan Ukuran DNA Dalam Base Pair Pada Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 45 Menit**

Berdasarkan hasil pada tabel 4.2 dan gambar 4.4 dapat diketahui ketebalan pita pada masing - masing DNA target pada variasi konsentrasi agarose 1%, 1,5% dan 2% dengan lama waktu elektroforesis 45 menit yang diukur menggunakan aplikasi *ImageJ*. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 101 bp (untuk mutasi S315T) yaitu 21.446.714, ukuran 141 bp (mutasi S315N) yaitu 33.939.505, ukuran 200 bp (mutasi S315I) 24.922.614, ukuran 247 bp (mutasi S315R) 25.413.664, ukuran 290 bp (mutasi S315G) 19.346.442 dan untuk target gen katG kodon 463

dengan ukuran 400 bp (mutasi R463L) diperoleh letebalan 32.350.392 pada konsentrasi agarose 2%.

**Hasil Elektroforesis Dengan Variasi Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Pada Waktu 60 Menit**



**Gambar 4.5 Perbandingan Visualisasi Hasil Elektroforesis**

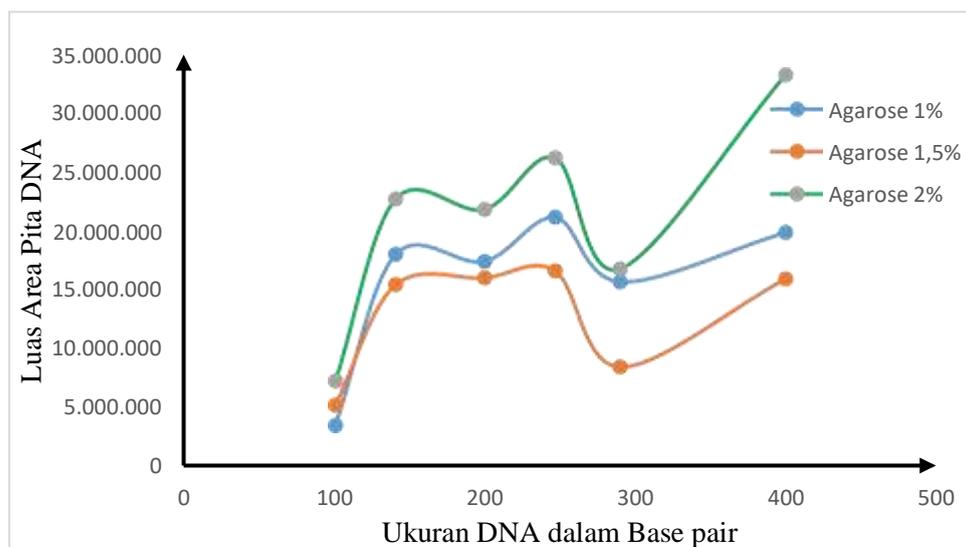
***Mycobacterium tuberculosis* Resistan Isoniazid Pada Konsentrasi Agarose (a) 1%, (b) 1,5% Dan (c) 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 60 Menit**

Pada gambar 4.5 menunjukkan visualisasi hasil elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid pada konsentrasi agarose bervariasi mulai dari 1%, 1,5% dan 2% dengan lama waktu elektroforesis selama 60 menit. Pada penelitian ini digunakan ladder berukuran 100 bp, terlihat pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid dengan ukuran pasang basa yang bervariasi. Proses elektroforesis dengan lama

waktu elektroforesis 60 menit memberikan pemisahan fragmen DNA marker dengan baik dimana marker sudah terpisah menjadi 11 pita DNA dan jarak anatar pita DNA ladder sangat jelas, kemudian dilakukan kuantifikasi intensitas pita DNA menggunakan aplikasi *imageJ*. Hasil pengukuran luas area pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan Isoniazid menggunakan aplikasi *imageJ* pada konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% dengan lama waktu elektroforesis 30 menit seperti pada tabel 4.3.

**Tabel 4.3 Hasil Pengukuran Luasa Area Pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* Resistan Isoniazid Pada Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 60 Menit**

| DNA Target | Luas Area Pita DNA      |            |            |
|------------|-------------------------|------------|------------|
|            | Konsentrasi Gel Agarose |            |            |
|            | 1%                      | 1,5%       | 2%         |
| S315T      | 3.502.492               | 5.207.342  | 7.260.049  |
| S315N      | 17.993.718              | 15.428.057 | 22.689.673 |
| S315I      | 17.383.179              | 15.996.128 | 21.791.329 |
| S315R      | 21.140.007              | 16.582.714 | 26.171.957 |
| S315G      | 15.659.329              | 8.445.522  | 16.758.329 |
| R463L      | 19.847.702              | 15.906.551 | 33.205.463 |



**Gambar 4.6 Grafik Gambaran Luas Area Pita DNA Dengan Ukuran DNA Dalam Base Pair Pada Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 60 Menit**

Pada tabel 4.3 dan gambar 4.6 dapat diketahui ketebalan pada masing - masing pita DNA target pada variasi konsentrasi agarose 1%, 1,5% dan 2% dengan lama waktu elektroforesis 60 menit yang diukur menggunakan aplikasi *ImageJ*. Ketebalan pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 101 bp (untuk mutasi S315T)

yaitu 7.260.049, ukuran 141 bp (mutasi S315N) yaitu 22.689.673, ukuran 200 bp (mutasi S315I) 21.791.329, ukuran 247 bp (mutasi S315R) 26.171.957, ukuran 290 bp (mutasi S315G) 16.758.329 dan untuk target gen katG kodon 463 dengan ukuran 400 bp (mutasi R463L) diperoleh ketebalan 33.205.463 pada konsentrasi agarose 2%.

**Tabel 4.4 Hasil Pengukuran Luasa Area Pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* Resistan Isoniazid Pada Konsentrasi Agarose 1%, 1,5% dan 2% Dengan Lama Waktu Elektroforesis 30, 45, dan 60 Menit**

| Variasi lama Waktu Elektroforesis | DNA Target     | Luas Area Pita DNA hasil Pengukuran <i>imageJ</i> |            |            |
|-----------------------------------|----------------|---|------------|------------|
|                                   |                | Konsentrasi Gel Agarose                           |            |            |
|                                   |                | 1%  | 1,5%       | 2%         |
| 30 menit                          | S315T (101 bp) | 11.792.522  | 3.326.811  | 6.988.903  |
|                                   | S315N (141 bp) | 26.920.898  | 20.124.693 | 19.864.752 |
|                                   | S315I (200 bp) | 14.720.149  | 9.809.711  | 15.290.095 |
|                                   | S315R (247 bp) | 19.481.371  | 9.875.933  | 15.963.530 |
|                                   | S315G (290 bp) | 11.134.045  | 5.804.740  | 11.848.874 |
|                                   | R463L (400 bp) | 19.253.610  | 11.267.983 | 14.693.995 |
| 45 menit                          | S315T (101 bp) | 19.815.969  | 5.384.217  | 21.446.714 |
|                                   | S315N (141 bp) | 26.802.032  | 13.671.685 | 33.939.505 |
|                                   | S315I (200 bp) | 6.536.078   | 13.375.563 | 24.922.614 |
|                                   | S315R (247 bp) | 10.768.723  | 14.224.652 | 25.413.664 |
|                                   | S315G (290 bp) | 7.595.217   | 11.106.267 | 19.346.442 |
|                                   | R463L (400 bp) | 15.942.936  | 13.490.924 | 32.350.392 |
| 60 menit                          | S315T (101 bp) | 3.502.492   | 5.207.342  | 7.260.049  |
|                                   | S315N(141 bp)  | 17.993.718  | 15.428.057 | 22.689.673 |
|                                   | S315I (200 bp) | 17.383.179  | 15.996.128 | 21.791.329 |
|                                   | S315R (247 bp) | 21.140.007  | 16.582.714 | 26.171.957 |
|                                   | S315G (290 bp) | 15.659.329  | 8.445.522  | 16.758.329 |
|                                   | R463L(400 bp)  | 19.847.702  | 15.906.551 | 33.205.463 |

Pada tabel 4.4 tersebut disajikan nilai luas area pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid pada setiap perlakuan, dilakukan pengukuran dengan menggunakan aplikasi *imageJ*. Ketebalan pita DNA tertinggi untuk gen target *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 101 bp (untuk mutasi S315T) yaitu 21.446.714, ukuran 141 bp (mutasi S315N) yaitu 33.939.505, ukuran 200 bp (mutasi

S315I) yaitu 24.922.614, ukuran 290 bp (mutasi S315G) 19.346.442 diperoleh pada konsentrasi agarose 2% dengan lama waktu elektroforesis selama 45 menit. Ketebalan pita DNA tertinggi untuk gen target *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 247 bp (mutasi S315R) yaitu 26.171.957 dan Ketebalan pita DNA tertinggi untuk pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen

katG kodon 463 dengan ukuran 400 bp (mutasi R463L) yaitu 33.205.463, diperoleh

## PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan sampel yang merupakan produk *real time* PCR (qPCR) yang hasil akhirnya dinyatakan dengan nilai CT, namun karena primer yang digunakan merupakan penemuan baru yang belum pernah dilakukan pengujian, maka primer yang didesain untuk mendeteksi mutasi gen *katG Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid ini perlu dilakukan elektroforesis untuk meyakinkan keberadaan DNA mutasi dari gen *katG* yang mampu dideteksi oleh primer dengan pasang basa yang sesuai yaitu sebesar 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L).

Pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi agarose untuk mengetahui konsentrasi agarose yang optimal dan menghasilkan visualisasi pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid yang baik dengan panjang produk yang bervariasi serta diberikan perlakuan perubahan waktu elektroforesis, kemudian dilakukan pembacaan hasil elektroforesis secara manual dan menggunakan aplikasi *imageJ*. Berdasarkan panduan yang ditulis oleh Miller pada tahun 2010 mengenai alternatif penggunaan aplikasi *imageJ*.

Hasil pengukuran kualitas pita DNA dilakukan dengan menilai letak pita DNA dibandingkan dengan *ladder* 100 bp yang digunakan dalam penelitian ini, karena berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan lagu migrasi fragmen–fragmen standar (DNA *ladder*) yang telah diketahui ukurannya<sup>12</sup>. Pengukuran luas area yang pita DNA pada setiap sampel yang digunakan aplikasi *image*,

pada konsentrasi gel *agarose* 2% dengan lama waktu elektroforesis selama 60 menit.

dimana semakin besar nilainya maka, semakin tebal pita DNA terekspresi<sup>13</sup>.

Berdasarkan temuan pada penelitian ini, diketahui lama waktu elektroforesis berpengaruh terhadap jarak tempuh fragmen–fragmen DNA, dimana semakin lama waktu elektroforesis maka jarak tempuh semakin jauh. Hal ini sejalan dengan literatur yang ditulis oleh Yahya pada tahun 2016. Selanjutnya dengan menggunakan nilai pengukuran pada aplikasi *imageJ* diperoleh variasi hasil ketebalan pita DNA untuk beberapa konsentrasi *agarose* dengan variasi lama waktu elektroforesis. Hal ini mungkin terjadi, mengingat sampel DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid yang digunakan dalam penelitian ini memiliki ukuran pasang basa yang bervariasi antara 101 bp sampai dengan 400 bp, sehingga ketebalan pita DNA sampel yang diperoleh pun cukup bervariasi. Namun hal ini masih sejalan dengan prinsip migrasi DNA dalam hubungannya dengan konsentrasi *agarose* yang ditulis oleh Betty Nurhayati dan Sri Darmawati, 2017 yaitu konsentrasi *agarose* yang dibutuhkan tergantung pada ukuran pasang basa dari fragmen DNA yang akan dianalisa. Semakin rendah konsentrasi gel *agarose*, maka semakin cepat migrasi fragmen DNA. Jadi, bila tujuan kita adalah untuk memisahkan fragmen DNA berukuran besar, maka perlu dibuat gel *agarose* dengan konsentrasi rendah. Sebaliknya, jika fragmen DNA yang hendak dipisahkan berukuran kecil, maka perlu dibuat gel *agarose* dengan konsentrasi tinggi.<sup>14</sup>

Hasil penelitian ini sejalan dengan literatur yang ditulis Green dan Sambotiok, Tahun 2019 dimana konsentrasi gel *agarose* untuk elektroforesis dengan ukuran DNA 0,1 – 2 kb baik menggunakan konsentrasi gel *agarose* 2% (b/v)<sup>15</sup>. Hasil penelitian ini

juga masih sejalan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Maksom dkk tahun 2018, penelitian terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (galur lokal Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat). Produk PCR dikarakterisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% (b/v) tegangan 80 V, arus 80 mA, dengan lama waktu elektroforesis selama 45 menit, dan menggunakan marker 100 pb. Hasil penelitian lain yang sejalan dilakukan Fauziah dkk, tahun 2020 identifikasi gen *katG* pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang dikultur pada *Mycobacteria growth indicator tube* (MGIT) diperoleh gen *katG* menggunakan metode PCR yang di elektroforesis pada gel agarose 2% (b/v) dengan dengan voltase 50 volt lama waktu elektroforesis yang dijalankan adalah 60 menit<sup>16</sup>.

Berdasarkan penelitian terhadap variasi konsentrasi agarose yang digunakan dan lama waktu elektriforesis untuk kesesuaian pasang basa pita DNA produk PCR dengan ukuran DNA yang muncul dikurva amplifikasi pada beberapa gen target dengan panjang produk yang bervariasi diantaranya 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L).

Variasi konsentrasinya agarose yang dilakukan pada proses elektriforesis ini adalah konsentrasi (b/v) 1%, 1,5% dan 2% yang kemudian pada masing-masing konsentrasi dilakukan proses elektroforesis dengan waktu yang bervariasi yaitu 30 menit, 45 menit dan 60 menit. Agarose yang telah melalui proses elektroforesis pada waktu yang ditentukan kemudian dilakukan perendaman dengan pewarna *diamond* yang dilarutkan dalam TAE 1X, lama perendaman setiap agar sama yaitu 30 menit. Pita DNA yang terbentuk kemudian dianalisis ukurannya dengan dibandingkan pada *ladder* yang digunakan pada setiap gel elektroforesis. Selanjutnya luas area

pita DNA dianalisa menggunakan aplikasi *ImageJ* dimana semakin besar luas area yang terukur maka semakin tebal pita DNA yang terbentuk. Ketebalan pita DNA yang terbentuk pada setiap sampel disemua variasi konsentrasi agarose dengan semua variasi waktu elektroforesisnya dibandingkan.

*Ladder* yang digunakan pada penelitian ini adalah *ladder* berukuran 100 bp dengan 11 pita DNA yang ukurannya terdiri dari 100 bp, 200bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1.000 bp dan 1500 bp. Berdasarkan pengamatan pada hasil elektroforesis yang dilakukan dengan semua variasi konsentrasi agarose dan variasi lama waktu elektriforesis, memberikan hasil visualisasi *ladder* dengan pemisahan ukuran pita DNA yang baik. Tampak ada 11 pita DNA yang terpisah dengan baik pada setiap konsentrasi agarose disetiap variasi waktu elektriforesis yang diberikan.

Berdasarkan perbandingan dengan *ladder* pada semua sampel penelitian dengan panjang produk yang diharapkan diantaranya 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L) berada pada ukuran yang sesuai.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa : Konsentrasi agarose yang optimal pada proses elektroforesis untuk mendapatkan pita DNA yang baik pada sampel *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid adalah pada konsentrasi agarose 2% dengan lama waktu elektroforesis optimal yaitu selama 45 menit dan 60 menit.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Keluarga, sahabat dan Dosen Poltekkes Kemenkes Bandung yang telah banyak membantu dan memberi dukungan

selama penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

#### DAFTAR RUJUKAN

1. Cloridina H. Mengenal Tuberkulosis Kebal Obat. *Dinas Kesehatan DI Yogyakarta*. Published online 2021:1-5.
2. Kemenkes. Pedoman Manajemen Terpadu Pengendalian Tuberkulosis Resisten Obat. 2013;(May):106.
3. Nugrahaeni DK, Malik US. Analisis Penyebab Resistensi Obat Anti Tuberkulosis. *J Kesehatan Masy*. 2013;8(2):113-120.
4. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Technical Instructions for TB Examination Using Molecular Rapid Test. *Kementeri Kesehatan RI*. Published online 2017:1-170. [www.tbindonesia.or.id](http://www.tbindonesia.or.id)
5. Rao P, Chawla K, Shenoy VP, Mukhopadhyay C. Role of real-time PCR for detection of tuberculosis and drug resistance directly from clinical samples. *Indian J Tuberc*. 2016;63(3):149-153.  
doi:10.1016/j.ijtb.2016.08.002
6. Bollela VR, Namburete EI, Feliciano CS, Macheque D, Harrison LH, Caminero JA. Detection of katG and inhA mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20(8):1099-1104.  
doi:10.5588/ijtld.15.0864
7. Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2016;45:474-492.  
doi:10.1016/j.meegid.2016.09.004
8. Fauziah PN, Romlah S, Khozinul Asrori A. DETEKSI Mycobacterium tuberculosis DARI KULTUR MGIT BERDASARKAN GEN katG. *J Indones Med Lab Sci*. 2020;1(1):1-10. doi:10.53699/joimedlabs.v1i1.2
9. Weninggalih AA. Desain Primer dan Probe Untuk Deteksi Mutasi Gen katG Mycobacterium tuberculosis Secara In Silico. Published online 2023:31-41.
10. Promega. Pewarna Asam Nukleat Diamond™: Alternatif Sensitif terhadap Pewarna SYBR®. Published online 2023:1-7.
11. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide User Guide ImageJ. *Image J user Guid*. 2012;1.46r.  
doi:10.1038/nmeth.2019
12. Steward K. Agarose Gel Electrophoresis: How it Works. *Bright Hub*. Published online 2022.
13. Lukemiller. Analyzing gels and western blots with ImageJ. *Search*. Published online 2010:1-14.
14. Nurhayati, Betty.; Darmawati S. Biologi Sel dan Molekuler. Published online 2017.
15. Green MR, Sambrook J. Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(1):6-15.  
doi:10.1101/pdb.top100388
16. Maksum IP, Suhaili S, Amalia R, Kamara DS, Rachman SD, Rachman RW. PCR Multipleks untuk Identifikasi Mycobacterium tuberculosis Resisten terhadap Isoniazid dan Rifampisin pada Galur Lokal Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat. *J Kim Val*. 2018;4(2):107-118.  
doi:10.15408/jkv.v4i2.7226