

VARIASI KONSENTRASI DAN PENGGUNAAN BUFFER TRIS
ACETAT EDTA BERULANG TERHADAP KUALITAS PITA DNA
Mycobacterium tuberculosis

Rosmini ^{1)*}, Zuri Rismiarti ²⁾, Asep Iin Nur Indra³⁾, Yeni Wahyuni⁴⁾

^{1*,2,3,4)} *Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Bandung, Bandung, Indonesia*

E - mail : rosmini1902@gmail.com

Nomor WA : 085624124979

Abstrak

Latar Belakang: *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten isoniazid (INH) terjadi akibat mutasi gen, sebagian besar terjadi pada gen katG. Telah ditemukan primer untuk mengidentifikasi mutasi pada gen katG terjadi dengan panjang produk primer yang bervariasi. Namun hal ini belum dibuktikan secara laboratorium. Dilakukan variasi konsentrasi buffer TAE 0,5x, 1x, dan 1,5x, dan penggunaan buffer TAE secara berulang. Hal ini untuk melihat pengaruh variasi konsentrasi terhadap kualitas pita DNA *Mycobacterium tuberculosis*. **Metode:** Jenis penelitian yang dipakai adalah quasi eksperimen, Subyek penelitian yang digunakan adalah larutan buffer TAE dengan konsentrasi 0,5x, 1x dan 1,5x yang digunakan secara berulang pada tahap elektroporesis, bahan pemeriksaannya adalah DNA *Mycobacterium tuberculosis* hasil PCR. Visualisasi hasil elektroforesis pada seluruh sampel dibandingkan dengan ukuran ladder yang digunakan dan semua produk yang dihasilkan berada pada ukuran base pair yang sesuai. Penggunaan aplikasi ImageJ dalam proses analisa ukuran DNA menjadi salah satu alternatif yang bisa membantu menilai ukuran pita DNA. **Hasil Penelitian:** Pada hasil penelitian yang dilakukan, ditemukan bahwa pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten isoniazid (INH) gen katG untuk MDR TB pada kodon 315 dengan ukuran produk 101 bp S315T, 141 bp S315N, 200 bp S315I, 247 bp S315R, 290 bp S315G dan 400 bp R463L diperoleh kepadatan pita DNA pada elektroforesis dengan menggunakan konsentrasi buffer TAE 0,5x ditunjukkan dengan luas area yang terbentuk paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 1x dan 1,5x, dan dari penggunaan berulang buffer TAE sebanyak dua kali didapatkan visualisasi pita DNA yang masih baik, hanya saja mempengaruhi luas area pita DNA ketika dibaca menggunakan aplikasi ImageJ. **Kesimpulan:** konsentrasi buffer TAE 0,5x yang mampu memberikan luas area paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi buffer TAE 1x dan 1,5x. Dari proses pengulangan tidak mempengaruhi visualisasi pita DNA namun berpengaruh terhadap luas area yang terbentuk semakin kecil.

Kata kunci: Elektroforesis; Konsentrasi buffer TAE; *Mycobacterium tuberculosis*; Penggunaan berulang buffer TAE

Abstract

Background: *Mycobacterium tuberculosis* Isoniazid-resistant (INH) occurs due to gene mutations, mostly in the katG gene. Primers have been found to identify mutations in the katG gene that occur with varying lengths of primer products. However, this has not been proven laboratory-wise. Varying TAE buffer concentrations of 0.5x, 1x, and 1.5x were carried out, and repeated use of TAE buffer. This is to see the effect of concentration variations on the quality of the *Mycobacterium tuberculosis* DNA band. **Method:** The type of research used was quasi-experimental. The research subjects used were TAE buffer solution with concentrations of 0.5x, 1x and 1.5x which were used repeatedly at the electrophoresis stage. The examination material was *Mycobacterium tuberculosis* DNA resulting from PCR. Visualization of electrophoresis results on all samples compared to the size of the ladder used and all products produced are at the appropriate base pair size. Using the ImageJ application in the DNA size analysis process is an alternative that can help assess the size of DNA bands. **Research Results:** In the results of the research carried out, it was found that the isoniazid (INH) resistant *Mycobacterium tuberculosis* DNA band of the katG gene for MDR TB was at codon 315 with product sizes of 101 bp S315T, 141 bp S315N, 200 bp S315I, 247 bp S315R, 290 bp S315G and 400 bp R463L obtained DNA band density on

electrophoresis using a TAE buffer concentration of 0.5x, shown by the highest area formed compared to concentrations of 1x and 1.5x, and from repeated use of TAE buffer twice, visualization of the DNA bands was still good. it just affects the area of the DNA band when read using the ImageJ application. Conclusion: 0.5x TAE buffer concentration is able to provide the highest area compared to 1x and 1.5x TAE buffer concentrations. The editing process does not affect the visualization of the DNA bands but does influence the area formed to become smaller.

Keywords: Electrophoresis; Mycobacterium tuberculosis; repeated use of TAE buffer; TAE buffer concentration

1. Pendahuluan

Metode lain untuk pemeriksaan tuberkulosis (TB) selain melalui pemeriksaan secara mikroskopis dan Tes Cepat Molekuler (TCM) yaitu dengan *Real Time* PCR (qPCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbandingan hasil positif pemeriksaan *Mycobacterium tuberculosis* mikroskopik, kultur, dan qPCR masing - masing sebesar 37%, 44%, dan 46%. Sensitivitas 100% dan spesifisitas 96,5% dalam mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada qPCR dibandingkan dengan metode kultur, didapatkan sensitivitas dan spesifisitas 38,1% dan 74,5% untuk kultur pada sampel dahak yang pemeriksaan bakteri tahan asam negatif (Swai dkk., 2011). Metode qPCR dapat mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid dan resistan rifampisin (Rao dkk., 2016)

Resistansi terhadap isoniazid terjadi akibat mutasi gen *Mycobacterium tuberculosis* pada salah satu atau beberapa gen, diantaranya adalah gen kat G (Unissa dkk., 2016). Hasil penelitian Weninggalih pada tahun 2023 telah meneliti 6 pasang primer dan probe untuk deteksi gen kat G untuk *Multi Drugs Resistant Tuberculosis* (MDR TB) pada kodon 315 dan 463 secara *in silico*. Ditemukan primer untuk mengidentifikasi mutasi pada gen kat G 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) (Weninggalih, A. 2023). Namun penelitian ini belum dibuktikan secara laboratorium, berdasarkan hasil penelitian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk membuktikan besaran basepair yang didapatkan secara *in silico*.

Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk analisis kualitatif sampel DNA. Penggunaan marker yang tepat dapat menilai integritas DNA dan mengukur fragmen DNA yang berbeda (Azam, 2012; Hanum, 2015). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses elektroforesis, faktor-faktor tersebut diantaranya adalah ukuran molekul DNA, konsentrasi gel agarosa, konformasi DNA, voltase, keberadaan pewarna DNA, komposisi *buffer* elektroforesis. *Buffer* Tris-Acetate-EDTA (TAE) merupakan salah satu larutan *buffer* sebagai pelarut gel agarosa dalam proses elektroforesis (Sinaga, 2017).

Pada penelitian Pettegrew dkk (2009) mengenai *buffer* Tris Glisin yang bisa digunakan beberapa kali dalam protein elektrotransfer disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan kualitas pita yang diamati pada semua pita protein yang ada sampai penggunaan pengulangan *buffer* transfer yang kelima, setelah itu terlihat penurunan kualitas pita hasil transfer protein. Pengulangan

penggunaan *buffer* Tris Glisin yang mengandung metanol tersebut bermaksud untuk mengurangi limbah beracun terbuang secara langsung ke lingkungan sekitar. Pada penelitian Sanderson dkk (2014) menunjukkan bahwa konsentrasi EDTA dan komponen asam-basa utama dapat dimodifikasi untuk mengurangi produksi arus, mengurangi pemanasan dan potensi artefak pita DNA yaitu dengan menggunakan *buffer* TB 1x, 0,5x, dan 0,3x.

Buffer penyangga pada proses elektroforesis yang sering dipakai adalah *Buffer* Tris-borate-EDTA dan *Buffer* Tris-Acetate-EDTA, akan tetapi TAE bekerja lebih baik untuk melakukan ekstraksi DNA dari gel agarose. Selama ini *buffer* TAE banyak yang hanya digunakan satu kali pemakaian, sehingga sisa *buffer* TAE banyak yang di buang. Disamping itu kandungan *buffer* TAE dapat bersifat toksik pada kehidupan perairan dengan efek jangka panjang (Merck, 2022). Beberapa sifat dari larutan *buffer* itu sendiri dapat menyebabkan reaksi terhadap kulit dan lapisan mukosa, diantaranya dapat terjadi iritasi kulit, alergi sampai kulit merasa terbakar. Mampu menyebabkan iritasi mata yang serius dan fatal bila terhirup. Pengulangan penggunaan *buffer* bertujuan untuk mengurangi terakumulasinya sisa *buffer* yang dibuang, adapun variasi konsentrasi digunakan bertujuan untuk mengkaji beberapa variasi konsentrasi yang mampu menghasilkan kualitas pita DNA yang baik.

2. Bahan dan Metode

- 1) Desain penelitian: Penelitian yang dilakukan adalah Quasi Eksperimen, yaitu untuk melihat kualitas pita DNA yang dihasilkan dari proses elektroforesis, menggunakan variasi konsentrasi *buffer* TAE 0,5x, 1x dan 1,5x dan penggunaan *buffer* TAE berulang pada konsentrasi *buffer* TAE yang optimum. Pada pelaksanaannya, *buffer* TAE yang optimum tersebut akan digunakan kembali untuk proses elektroforesis selanjutnya.
- 2) Waktu dan tempat penelitian: Penelitian ini dilakukan pada Bulan Oktober sampai November 2023 di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung. Obyek penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah larutan *buffer* TAE dengan konsentrasi 0,5x, 1x dan 1,5x dan penggunaan berulang pada *buffer* TAE yang optimum. Adapun perlakuan yang dilakukan pada yang optimum tersebut yaitu digunakan segar, pengulangan ke-1 dan pengulangan ke-2. Hasil visualisasi pita DNA yang terbentuk diukur menggunakan aplikasi *Image J* dengan hasil ukur berupa luas area.
- 3) Alat dan bahan: Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Mikropipet (Socorex), tip sesuai ukuran, labu erlenmeyer (Iwaki), *hot plate* (Maspion), *chamber*, comb/sisir, tray, timbangan digital (Fujitsu), spatula, alat elektroforesis (Clever Scientific) dengan delapan lubang sumur, gelas ukur (Iwaki), UV transilluminator (Clever Scientific), Hp Samsung Galaxy M32, komputer. Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Buffer* TAE stok 50x (Promega), bubuk agarosa (Promega), pewarna diamond (Promega), Aquabidest (Generik), DNA *Mycobacterium tuberculosis* hasil PCR disertai dengan DNA marker sebagai kontrol. Data yang digunakan adalah data primer yang diperoleh dari

pengukuran luas area pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* hasil elektroforesis dengan variasi konsentrasi *buffer* TAE dan penggunaan *buffer* TAE optimum berulang. Data luas area pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh dengan melakukan pengukuran foto hasil visualisasi DNA *Mycobacterium tuberculosis* dari UV transilluminator pada aplikasi ImageJ.

- 4) Pembuatan *Buffer* TAE 0,5x: yaitu dengan mengukur 5 mL *buffer* stok 50x kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 495 mL. Pembuatan *buffer* TAE 1x yaitu dengan mengukur 10 mL *buffer* stok 50x kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 490 mL, dan *buffer* TAE 1,5x yaitu dengan mengukur 15 mL *buffer* stok 50x kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 485 mL.
- 5) Pembuatan gel agarosa 1,5%: menimbang bubuk agarose sebanyak 0,6gram dilarutkan dengan 40 mL *buffer* TAE 1x di dalam labu erlenmeyer, dipanaskan diatas *hot plate* sampai menjadi homogen dan jernih, ditunggu sampai hangat kemudian dituangkan kedalam tray yang telah dipasangkan sisir, sisir dilepaskan apabila gel sudah mengeras.
- 6) Tahapan elektroforesis : gel yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis, ditambahkan larutan *buffer* TAE 1x sampai gel agarose terendam, dipipet DNA marker ke dalam sumur pertama, dipipet campuran sampel produk PCR dengan loading dye dan dimasukkan ke sumur berikutnya, ditempatkan tutup tangki dengan elektroda hitam ke hitam dan merah ke merah, dipastikan alat elektroforesis tertutup dengan benar, voltase yang digunakan adalah 100 volt dengan lama waktu elektroforesis 45 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, daya listrik dimatikan, gel agarose diangkat dan ditiriskan.
- 7) Perendaman gel dengan menggunakan pewarna diamond yaitu dengan melarutkan 5uL pewarna diamond ke dalam 50 mL larutan *buffer* TAE 1x, gel agarose hasil elektroforesis direndamkan pada pewarna diamond yang telah diencerkan selama 30 menit.
- 8) Pembacaan gel di bawah alat UV transilluminator: gel agarose yang sudah direndam diangkat dan ditiriskan kemudian diletakkan di atas alat UV transiluminator di ruang gelap, lampu UV dinyalakan. Hasil visualisasi dari alat UV transilluminator kemudian di foto menggunakan HP Samsung M32, dari foto tersebut kemudian dilakukan pengolahan data dengan menggunakan aplikasi ImageJ yang hasilnya berupa luas area yang terbentuk dari visualisasi pita DNA tersebut. No etik, No.72/KEPK/EC/XII/2023 POLTEKKES KEMENKES BANDUNG.

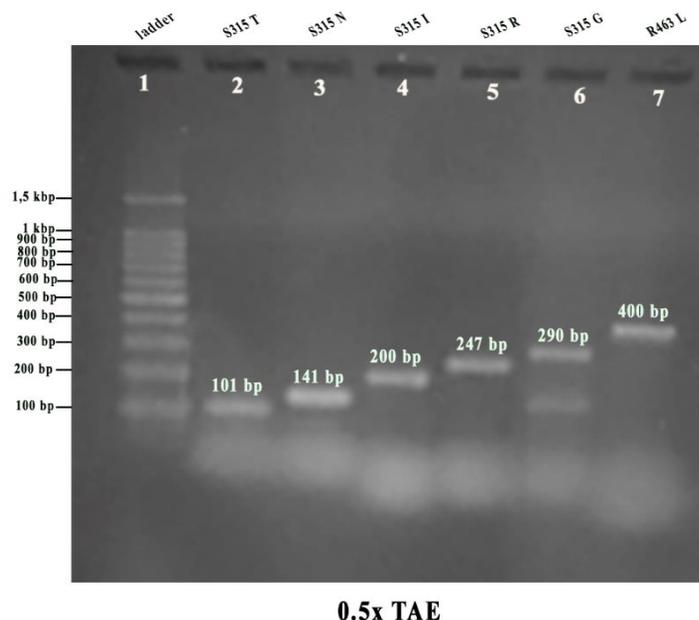
3. Hasil

Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian yang diawali dengan penemuan primer baru untuk deteksi mutasi yang terjadi pada DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan INH gen kat G kodon 351 dan 463 secara *in silico*. Namun penelitian ini belum dibuktikan secara laboratorium, sehingga dilakukan penelitian lebih lanjut. Rangkaian penelitian lanjutan dilakukan variasi konsentrasi *buffer* TAE yang digunakan dan pengulangan penggunaan *buffer* TAE optimum untuk kesesuaian pasang basa pita DNA produk PCR dengan ukuran DNA yang muncul pada kurva

amplifikasi pada beberapa gen target 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) (Weninggalih, A. 2023).

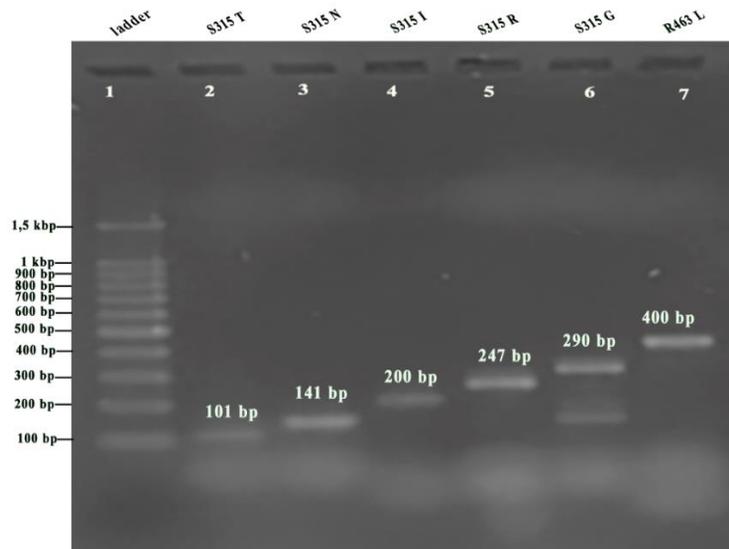
Variasi konsentrasi *buffer* TAE yang digunakan pada proses elektroforesis ini adalah konsentrasi 0,5x, 1x, dan 1,5x, dari hasil perhitungan luas area dengan menggunakan aplikasi ImageJ (Ferreira, T. 2019). Didapatkan luas area yang paling tinggi pada konsentrasi 0,5x (Gambar 4), kemudian dari konsentrasi *buffer* TAE 0,5x tersebut dilakukan pengulangan proses elektroforesis dengan menggunakan *buffer* yang sama sebanyak 2x pengulangan. Persentase gel agarosa yang digunakan adalah konsentrasi 1,5% dan lama waktu elektroforesis 45 menit. Setelah proses elektroforesis selesai selanjutnya dilakukan pewarnaan gel dengan pewarna diamond yang dilarutkan dalam TAE 1x, lama perendaman agar yaitu 30 menit (Promega, 2023). Pita DNA yang terbentuk kemudian dilakukan pengukuran luas area pita DNA menggunakan aplikasi ImageJ, dimana semakin besar luas area yang terukur maka semakin tebal pita DNA yang terbentuk. Ketebalan pita yang terbentuk di setiap sampel pada konsentrasi *buffer* TAE 0,5x dan penggunaan berulang *buffer* dibandingkan (Gambar 5).

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 *buffer* TAE dan penggunaan berulang *buffer* TAE 0,5x, memberikan hasil visualisasi ladder dengan pemisahan ukuran pita DNA yang baik. Tampak ada 11 pita DNA yang terpisah dengan baik pada konsentrasi *buffer* TAE 0,5x dan pada penggunaan berulang *buffer* TAE 0,5x.



Gambar 1. Gambaran visualisasi hasil elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid menggunakan konsentrasi *buffer* TAE 0,5x yang digunakan segar

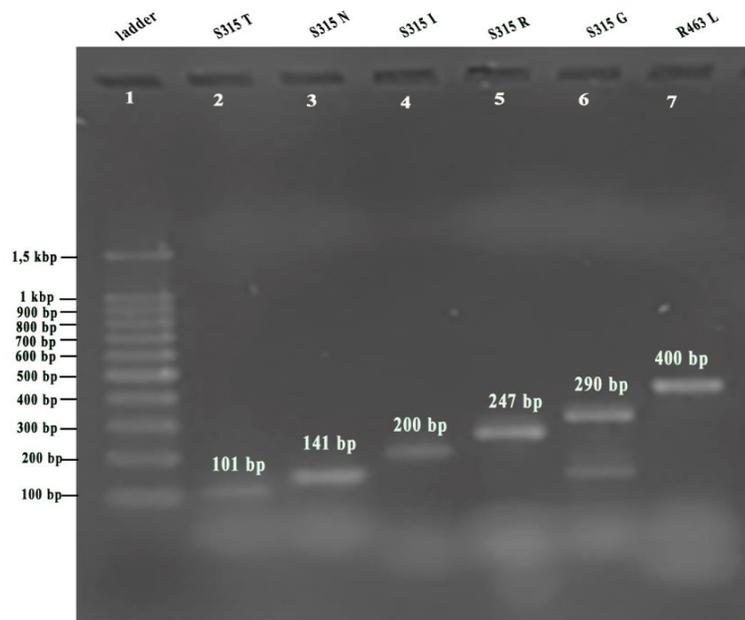
Berdasarkan pengamatan dari hasil elektroforesis pada Gambar 1 dengan menggunakan *buffer* TAE 0,5x yang digunakan segar, perbandingan dengan ladder pada semua sampel penelitian dengan panjang produk yang diharapkan diantaranya 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L) berada pada ukuran yang sesuai.



1x TAE

Gambar 1. Gambaran visualisasi hasil elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid menggunakan konsentrasi *buffer* TAE 1x yang digunakan segar

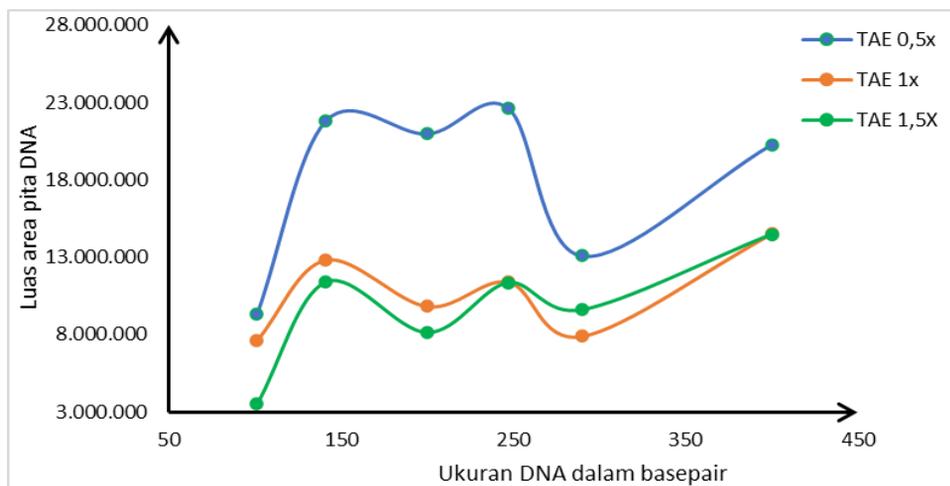
Berdasarkan pengamatan dari hasil elektroforesis pada Gambar 2 dengan menggunakan *buffer* TAE 1x yang digunakan segar, perbandingan dengan ladder pada semua sampel penelitian dengan panjang produk yang diharapkan diantaranya 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L) berada pada ukuran yang sesuai.



1.5x TAE

Gambar 2. Gambaran visualisasi hasil elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid menggunakan konsentrasi buffer TAE 1,5x yang digunakan segar

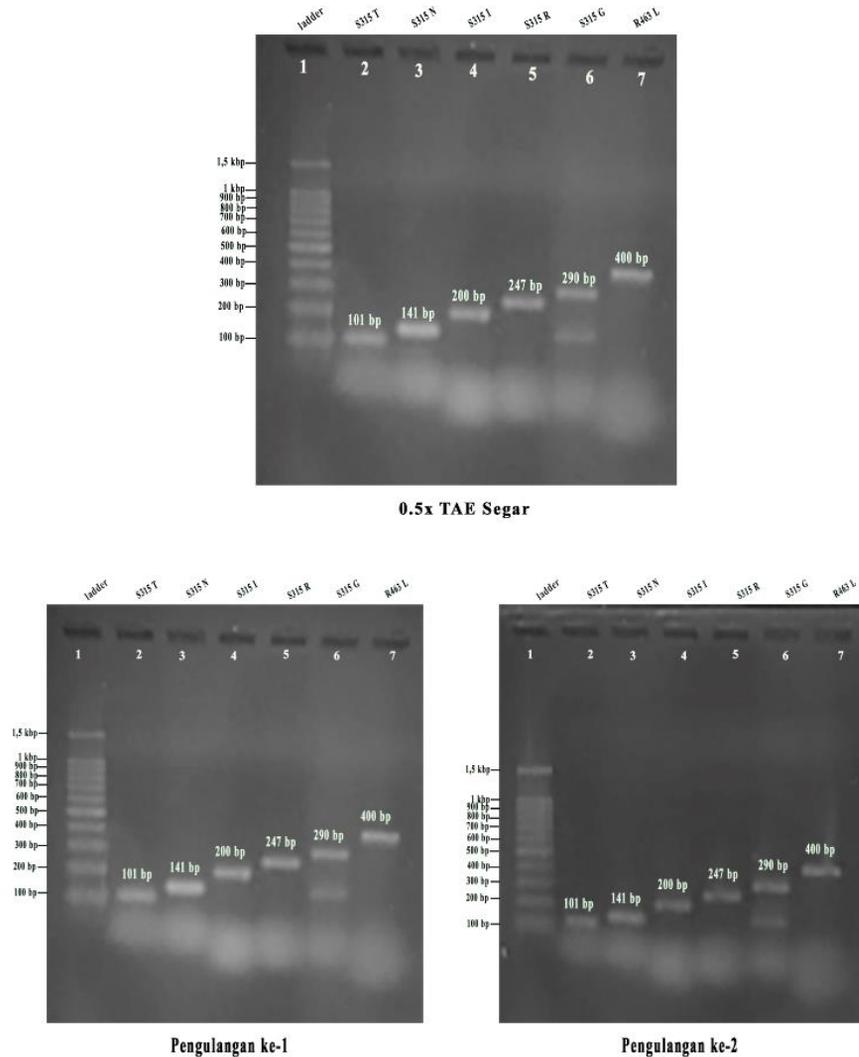
Berdasarkan pengamatan dari hasil elektroforesis pada Gambar 3 dengan menggunakan *buffer* TAE 1,5x yang digunakan segar, perbandingan dengan ladder pada semua sampel penelitian dengan panjang produk yang diharapkan diantaranya 101 bp (untuk mutasi S315T), 141 bp (mutasi S315N), 200 bp (mutasi S315I), 247 bp (mutasi S315R), 290 bp (mutasi S315G), dan 400 bp (mutasi R463L) berada pada ukuran yang sesuai.



Gambar 3. Grafik hasil luas area pita DNA dengan menggunakan variasi konsentrasi buffer TAE 0,5x, 1x, dan 1,5x yang digunakan segar

Berdasarkan pengukuran luas area pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* yang terbentuk dari hasil visualisasi gel elektroforesis menggunakan variasi konsentrasi dengan menggunakan

aplikasi ImageJ, kemudian dibuat grafik seperti pada Gambar 4. dari grafik tersebut dapat di ambil kesimpulan bahwa luas area yang terbentuk yang paling tinggi didapatkan dari visualisasi hasil elektroforesis pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan *buffer* TAE 0,5x.



Gambar 4. Gambaran visualisasi hasil elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid menggunakan *buffer* TAE konsentrasi 0,5x digunakan segar, pengulangan ke-1 dan pengulangan ke-2

Dari gambaran visualisasi hasil elektroforesis *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid menggunakan *buffer* TAE konsentrasi 0,5x digunakan segar, pengulangan ke-1 dan pengulangan ke-2 didapatkan visualisasi pita DNA yang masih bisa terlihat, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pettegrew dkk (2009) mengenai *buffer* Tris Glisin yang bisa

digunakan beberapa kali dalam protein elektrotransfer disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan kualitas pita yang diamati pada semua pita protein yang ada sampai penggunaan pengulangan *buffer* transfer yang kelima, setelah itu terlihat penurunan kualitas pita hasil transfer protein.

Tabel 1 Hasil pengukuran luas area DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid pada konsentrasi *buffer* TAE 0,5x yang digunakan segar, pengulangan ke-1 dan pengulangan ke-2

No	DNA Target	Basepair	Luas Area Pita DNA		
			Segar	Pengulangan ke-1	Pengulangan ke-2
1	S315T	101	9.325.673	9.102.037	5.702.782
2	S315N	141	21.812.463	18.069.572	15.484.087
3	S315I	200	20.975.321	15.583.108	14.625.530
4	S 315R	247	22.625.250	14.685.581	19.259.087
5	S315G	290	13.097.137	11.280.823	14.155.602
6	R463L	400	20.283.794	18.106.551	17.131.167

Pada Tabel 1 dapat dilihat hasil luas area pita DNA *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid target gen katG kodon 315 dengan ukuran 101 bp (untuk mutasi S315T) yaitu 9.325.673, ukuran 141 bp (mutasi S315N) yaitu 21.812.463, ukuran 200 bp (mutasi S315I) yaitu 20.975.321, ukuran 247 bp (mutasi S315R) yaitu 22.625.250, dan gen katG kodon 463 dengan ukuran 400 bp (mutasi R463L) ketebalannya yaitu 20.283.794, paling baik diperoleh pada penggunaan *buffer* TAE 0,5x yang digunakan segar. Dari data tersebut menunjukkan bahwa pemakaian *buffer* TAE yang segar memiliki luas area pita DNA yang tinggi di ikuti dengan luas area pengulangan penggunaan *buffer* ke-1 dan pengulangan penggunaan *buffer* ke-2. Hal ini sejalan dengan penelitian Pettegrew dkk (2009) yang menggunakan *buffer* transfer berulang sampai tujuh kali dan tetap membentuk pita DNA namun dengan intensitas warna yang semakin berkurang.

4. Pembahasan

Berdasarkan temuan pada penelitian ini, dengan menggunakan nilai pengukuran dengan aplikasi ImageJ terdapat variasi hasil ketebalan pita DNA pada beberapa konsentarsi *buffer* TAE dan dengan penggunaan berulang *buffer* TAE 0,5x. 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 luas area pita DNA sampel yang diperoleh pun cukup bervariasi.

Berdasarkan hal tersebut membuktikan bahwa semakin rendah konsentrasi *buffer* TAE, maka akan terjadi pergerakan molekul yang cepat dan menghasilkan panas yang rendah. Akibatnya luas area pita DNA yang terbentuk menjadi lebih tinggi. Oleh sebab itu konsentrasi *buffer* TAE 0,5x memiliki luas area pita DNA yang paling tinggi diantara konsentrasi *buffer* TAE 1x dan 1,5x. Hal ini sejalan dengan penelitian Saadah dkk (2020) yang pada tahap elektroforesis menggunakan *buffer* TAE 0,5x. Dengan demikian konsentrasi *buffer* TAE 0,5x dipilih dan digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya.

5. Kesimpulan dan Saran

Variasi konsentrasi *buffer* TAE 0,5x, 1x, dan 1,5x yang secara visual sudah tampak terlihat jelas pemisahan fragmen pita DNA pada ladder dan pita DNA pada sampel. Akan tetapi pada hasil perhitungan luas area dengan menggunakan aplikasi *ImageJ*, menghasilkan kurva yang paling tinggi pada konsentrasi *buffer* TAE 0,5x. Penggunaan berulang pada konsentrasi *buffer* TAE 0,5x yang digunakan segar, penggunaan berulang *buffer* TAE pertama dan pengulangan kedua tidak mempengaruhi visualisasi pita DNA yang terbentuk, hanya saja mempengaruhi luas area pita DNA ketika dibaca menggunakan aplikasi *ImageJ*. Semakin banyak pengulangan maka luas area pita DNA yang terbentuk semakin kecil. Untuk penelitian berikutnya dapat dilakukan optimasi pengulangan *buffer* TAE konsentrasi 0,5x.

6. Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada teman sejawat dan tim laboran yang sudah banyak berkontribusi dalam penelitian ini.

7. Daftar Pustaka

- Azam, A.D. (2012). Elektroforesis Gel Agarosa. *Blogspot*. <http://anadianaazam.blogspot.com/2012/06/elektroforesis-gel-agarosa>. Diakses pada 19 Oktober 2023.
- Ferreira T, Rasband W. *ImageJ User Guide*. *Image J user Guid*. 2012;1.46r. doi:10.1038/nmeth.2019
- Harahap, M.R. (2018). Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *Circuit: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1). <https://doi.org/10.22373/crc.v2i1.3248>. Di akses pada 20 Agustus 2023.
- Hanum, S. (2015). Isolasi Dna Plasmid Elektroforesis Dna Plasmid Pada Gel Agarosa Polymerase Chain Reaction (Pcr). In *Penuntun Praktikum Laboratorium Genetika Dan Biologimolekuler Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara*.
- Merck. (2022, November 8). Di unduh dari https://www.merckmillipore.com/Web-LU-Site/fr_FR/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-107210&DocumentType=MSD&DocumentId=107210_SDS_ID_ID.PDF&DocumentUID=372255&Language=ID&Country=ID&Origin=null. Di akses pada 15 Juli 2023.
- Pettegrew C.J., Jayini R. & Islam M.R. (2009). Transfer *Buffer* Containing Methanol Can Be Reused Multiple Times in Protein Electrotransfer. *Journal of Biomolecular Techniques*, 20(2), 93 – 95.
- Promega. Pewarna Asam NukleatDiamond™: Alternatif Sensitif terhadap Pewarna SYBR®.

Published online 2023:1-7

- Rao, P., Chawla, K., Shenoy, V.P., & Mukhopadhyay, C. (2016). Role of real-time PCR for detection of tuberculosis and drug resistance directly from clinical samples. *Indian Journal of Tuberculosis*, 63(3), 149–153.
- Sanderson B.A., Araki N., Lilley J.L., Guerrero G. & Lewis L.K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE *buffer* composition to minimize heating during agarosa gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 454, 44 – 52. doi:10.1016/j.ab.2014.03.003.
- Swai HF, Mugusi FM, Mbwambo JK. Sputum smear negative pulmonary tuberculosis: sensitivity and specificity of diagnostic algorithm. *BMC Res Notes*. 2011;4:475.
- Unissa, A.N., Subbian, S., Hanna, L.E., & Selvakumar, N. (2016). Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 45, 474–492. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.004>.
- Weninggalih, A. (2023). Desain Primer Dan Probe Untuk Deteksi Mutasi Gen katG *Mycobacterium tuberculosis* Secara In Silico. *Desain Primer Dan Probe Untuk Deteksi Mutasi Gen KatG Mycobacterium Tuberculosis Secara In Silico*, 4(1), 88–100.