

TESIS

KERAGAMAN GENETIK IMUNOGEN ESAT-6 dan EsxH *Mycobacterium tuberculosis* PADA ISOLAT KLINIS DI SULAWESI SELATAN

GENETIC DIVERSITY OF ESAT-6 and EsxH *Mycobacterium tuberculosis* IMMUNOGENS IN CLINICAL ISOLATES IN SOUTH SULAWESI

Disusun dan diajukan oleh

UMMI CHAERA

P062221032



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

HALAMAN JUDUL

KERAGAMAN GENETIK IMUNOGEN ESAT-6 dan EsxH *Mycobacterium tuberculosis* PADA ISOLAT KLINIS DI SULAWESI SELATAN

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

UMMI CHAERA

P062221032

kepada

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

**Keragaman Genetik Imunogen ESAT-6 dan EsxH
Mycobacterium tuberculosis pada Isolart Klinis di Sulawesi Selatan**

UMMI CHAERA

P062221032

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister 20 September 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin
Makassar
2024

Mengesahkan :

Pembimbing Utama



Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK(K)
NIP. 196709101996031001

Pembimbing Kedua



Doddy Irawan Setyo Utomo, S.Si. M.Agr. PhD
NIP. 198112272008011009

Ketua Program Studi
Ilmu Biomedik



Prof. dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.KHOM., FINASIM
NIP. 196802181999032002

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Budu, Ph.D., Sp.M (K), M.Med
NIP. 196612311995031009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul “Keragaman Genetik Imunogen ESAT-6 dan EsxH *Mycobacterium Tuberculosis* pada Isolat Klinis di Sulawesi Selatan” adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi., Ph.D., Sp.MK(K). sebagai Pembimbing Utama dan Doddy Irawan Setyo Utomo, PhD sebagai Pembimbing Pendamping. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jordan Journal of Biological Sciences sebagai artikel dengan judul “Analysis of EsxH Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* from Clinical Isolates in South Sulawesi Combine with Homology Modelling”. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 07 Oktober 2024



UMMI CHAERA
NIM P062221032

KATA PENGANTAR

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan disertasi ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi., Ph.D., Sp.MK(K). sebagai Pembimbing Utama dan pak Doddy Irawan Setyo Utomo,S.Si., M.Agr., PhD selaku pembimbing kedua saya. Tidak lupa pula saya sampaikan terima kasih banyak kepada Dr.dr.Najdah Hidayah atas bantuan dan ilmunya dari awal penelitian ini berlangsung sampai selesai. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada Tim HUMRC di Rumah Sakit Uiversitas Hasanuddin telah mengizinkan untuk melaksanakan penelitian dan kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium HUMRC. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program magister serta para dosen dan rekan-rekan dalam tim penelitian. Penghargaan tertinggi tak lupa saya sampaikan kepada kedua orang tua saya, Bapak Ali dan Ibu Masnah yang telah mendukung dan mendoakan saya selama studi magister ini, beserta keluarga besar saya. Terakhir, terima kasih kepada teman-teman saya, kak isra, kak alya, kak balqis, dan di lingkup lppm yang sudah memberikan kesempatan saya belajar dan berkembang selama masa studi ini. Sekali lagi terima kasih saya ucapkan yang sebesar-besarnya. Wassalam.

Penulis,

Ummi Chaera

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	2
HALAMAN PENGESAHAN	3
KATA PENGANTAR	5
DAFTAR ISI	6
DAFTAR TABEL	7
DAFTAR GAMBAR	7
ABSTRAK	8
ABSTRACT	9
BAB I PENDAHULUAN	10
1.1 Latar Belakang	10
1.2 Rumusan Masalah	12
1.3 Tujuan Penelitian	12
1.4 Manfaat Penelitian	13
BAB II	14
METODE PENELITIAN	14
2.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
2.2 Alat dan Bahan	14
2.3. Metode Penelitian	15
2.3.1 Kultivasi dan Isolasi DNA Genom	15
2.3.2 Amplifikasi Gen ESAT-6 dan EsxH Mycobacterium tuberculosis dengan PCR	15
2.3.3 Elektroforesis	16
2.3.4 Sekuensing	16
2.11 Kerangka Teori	17
2.12 Kerangka Konsep.....	17
Bab III	18
Hasil dan Pembahasan	18
3.1 Karakteristik Subjek penelitian	18
3.2 Amplifikasi Gen dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
3.3. Analisis Mutasi Hasil Sequencing	19
3.4 Filogenetik.....	20
3.5 Pembahasan.....	22

BAB IV	26
KESIMPULAN DAN SARAN	26
4.1 Kesimpulan.....	26
4. 2 Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Mutation analysis result of EsxH.....	20
---	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Elektroforesis gen pada 40 isolat klinis Mtb (a) ESAT-6, (b) EsxH...	19
Gambar 2 Substitusi nukleotida kodon G ke A 28 dan C ke T posisi 29 posisi gen EsxH.....	19
Gambar 3 Substitusi asam amino posisi 10 dari Alanin ke Theronin dengan kode sampel 11X dan sampel Alanin ke Valin sampel 30X.....	20
Gambar 4. Hasil Alignment gen EsxH dengan gen reference pada titik variasi (a) Nukleotida posisi 28 dan 29 (b) asam amino posisi ke 10 (c) Pohon filogenetik Maximum likelihood 500 bootstap (d) Pohon filogenetik Maximum likelihood 1000 bootstap.....	22

ABSTRAK

UMMI CHAERA. **Keragaman Genetik Imunogen ESAT-6 dan EsxH *Mycobacterium tuberculosis* pada Isolat Klinis di Sulawesi Selatan** (dibimbing oleh Muhammad Nasrum Massi dan Doddy Irawan Setyo Utomo).

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Protein Esx, khususnya ESAT-6 dan EsxH, merupakan antigen imunodominan yang penting dalam respons kekebalan dan dianggap sebagai target potensial dalam pengembangan vaksin. Studi mengenai polimorfisme gen ini pada populasi Mtb di Indonesia terkait gen ini masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme gen ESAT-6 dan EsxH pada isolat klinis Mtb dari Sulawesi Selatan serta melihat apakah terdapat pengaruhnya terhadap level asam amino dan hubungan filogenetik dengan strain lineage lain dari H37RV. Penelitian ini menggunakan 40 sampel klinis Mtb tersimpan dari Lab HUMRC untuk masing-masing gen. ESAT-6 dan EsxH diamplifikasi menggunakan PCR lalu dianalisis dengan metode Sanger Sequencing. Hasil amplifikasi menunjukkan fragmen gen ESAT-6 (946 bp) dan EsxH (951 bp) yang konsisten dan sesuai dengan ukuran target. Hasil sequencing yang alignment dengan software UGENE menunjukkan substitusi basa pada 2 isolat gen EsxH dengan perubahan basa sampel 11X dari G>A posisi 28 dan C>T posisi ke 29 pada sampel 30X, dan perubahan basa ini ternyata berpengaruh pada asam amino di posisi 10 dengan perubahan dari Alanine ke Threonine pada sampel 11X dan Alanin ke valine sampel 30X. Analisis filogenetik menunjukkan adanya hubungan antara polimorfisme pada isolat dari Sulawesi Selatan dengan strain Mtb dari garis keturunan M.Africanum, dengan jarak hubungan kekerabatan 58% pada bootstap 1000. Variasi ini dapat mempengaruhi respons kekebalan dan dapat dijadikan dasar untuk pengembangan vaksin TB yang lebih efektif dan spesifik.

Kata Kunci : EsxH, ESAT-6, Polimorfisme, Filogenetik, *Mycobacterium tuberculosis*,

ABSTRACT

UMMI CHAERA. **Genetic Diversity of ESAT-6 and EsxH Mycobacterium tuberculosis Immunogens in Clinical Isolates in South Sulawesi** (supervised by Muhammad Nasrum Massi and Doddy Irawan Setyo Utomo).

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Esx proteins, especially ESAT-6 and EsxH, are immunodominant antigens important in the immune response and are considered potential targets in vaccine development. Studies regarding the polymorphism of this gene in the Mtb population in Indonesia regarding this gene are still limited. This study aims to detect ESAT-6 and EsxH gene polymorphisms in Mtb clinical isolates from South Sulawesi and see whether there is an influence on amino acid levels and phylogenetic relationships with other lineage strains of H37RV. This study used 40 stored Mtb clinical samples from the HUMRC for each gene. ESAT-6 and EsxH were amplified using PCR and then analyzed using the Sanger Sequencing method. The amplification results showed that the ESAT-6 (946 bp) and EsxH (951 bp) gene fragments were consistent and matched the target size. Sequencing results aligned with UGENE software showed base substitutions in 2 isolates of the EsxH gene with a change in the base of the 11X sample from G>A position 28 and C>T position 29 in the 30X sample, and this base change apparently had an effect on the amino acid at position 10 with change from Alanine to Threonine in the 11X sample and Alanine to valine in the 30X sample. Phylogenetic analysis showed a relationship between polymorphisms in isolates from South Sulawesi and Mtb strains from the M.Africanum lineage, with a relationship distance of 58% at bootstrap 1000. This variation can influence the immune response and can be used for developing An effective and Specific TB vaccine.

Keywords: EsxH, ESAT-6, Polymorphism, Phylogenetics, *Mycobacterium tuberculosis*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) terus menjadi darurat global sampai saat ini. Menurut data WHO tahun 2021, diperkirakan 10,6 juta orang di seluruh dunia mengidap tuberkulosis (TB) (Who, n.d.) Indonesia merupakan negara dengan penyakit Tuberkulosis tertinggi kedua di dunia setelah India pada 2019. Berdasarkan Global TB Report 2021, diperkirakan ada 824.000 kasus TBC ditemukan Indonesia (Kemenkes, 2022) . Pasien dengan infeksi TB memiliki 5-10% risiko seumur hidup untuk mengembangkan penyakit TB, yang meningkat dalam berbagai keadaan imunodefisiensi hingga 16% risiko tahunan (Gill et al., 2022)

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi yang ditularkan melalui udara, dengan *Mycobacterium tuberculosis* sebagai agen penyebabnya. Penularan tuberkulosis sangatlah kompleks. Faktor-faktor yang diperlukan mencakup sumber kasus penyakit pernafasan yang telah cukup berkembang sehingga *Mycobacterium tuberculosis* dapat hadir di saluran pernafasan (Turner et al., 2017)

Data laporan Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan tahun 2021 mencatat terdapat 31.022 estimasi kasus TB di Sulsel, di mana baru sebanyak 14.808 kasus atau yang ternotifikasi yang jika dipersentasekan hanya 47,73%. Artinya, masih ada sekitar 53% yang tidak diketahui keberadaanya di tengah ancaman penularan yang juga besar. Angka notifikasi semua kasus tuberkulosis di Provinsi Sulawesi Selatan menduduki peringkat ke sebelas dari 34 provinsi yang ada di Indonesia (Kesehatan et al., 2024)

Upaya untuk menyelesaikan masalah global ini telah difokuskan pada beberapa strategi penting, yaitu untuk meningkatkan metode diagnosis dan vaksin yang efektif. Sampai saat ini solusi yang diberikan pemerintah adalah dengan pemberian vaksin BCG. Vaksin ini menginduksi respons Th1 yang kuat dan mempromosikan pengembangan sel T polifungsional dan sitotoksik spesifik mikobakteri. Namun, sejauh ini vaksin BCG diketahui tidak efektif dalam memberikan perlindungan pada orang dewasa dan mampu mengaktifkan kembali infeksi TB laten (Mohamed et al, 2020).

Faktor genetik host terhadap kerentanan TB telah lama menjadi perhatian penting. Lebih dari seratus kandidat gen telah dipelajari, namun hanya sedikit hubungan yang terbukti. Setiap garis keturunan TBC dapat memiliki karakteristik unik yang memengaruhi perkembangan penyakit, laju penularannya, resistensi terhadap obat tertentu, dan respons terhadap pengobatan. Keanekaragaman populasi patogen dapat mempengaruhi serangkaian fenotipe yang relevan secara klinis, termasuk virulensi, respons terhadap pengobatan, munculnya resistensi antibiotik, dan kemanjuran vaksin (Carey et al., 2022)

Analisis karakteristik biologi molekuler TB telah mengidentifikasi beberapa antigen sebagai agen virulensi yang berperan penting dalam patogenesis TB. Diketahui Protein Esx memiliki 23 jenis yang terlibat dalam interaksi inang-patogen *Mycobacterium tuberculosis*. Protein yang disekresikan ini merupakan salah satu antigen imunodominan yang paling dikenal oleh sistem kekebalan tubuh manusia dan karenanya telah digunakan untuk mengembangkan vaksin dan tes imunodiagnostik untuk tuberkulosis (TB). Antigen sel T yang paling sering dikenali dari *M. tuberculosis* adalah protein kecil yang disekresikan EsxA atau ESAT-6 (target antigenik sekretorik awal sebesar 6 kDa) dan Beberapa substitusi asam amino yang dihasilkan mempengaruhi epitop Esx yang diketahui, termasuk antigen EsxH (TB10.4) (Uplekar et al., 2011).

Early Secreted Antigen Target (ESAT-6) merupakan salah satu faktor virulen utama *Mycobacterium tuberculosis* yang merupakan antigen yang bersifat imunogenik dan dapat disekresi baik oleh bakteri *M.tb* dan wild type dari *M. bovis* dimana respon imun dapat diukur dan diamati setelah adanya produksi IFN- γ setelah distimulasi oleh antigen tersebut (Prihantika S. et al., 2019). Kemudian dari golongan ESX-3 ditemukan bahwa gen EsxH mengkodekan protein TB10.4, yang memunculkan respons sel T CD4 dan CD8 pada manusia dan tikus. Kompleks EsxG·EsxH juga diketahui terlibat dalam penyerapan logam, resistensi obat, dan penghindaran respons imun, karakteristik ini menjadikannya target ideal untuk pengembangan vaksin yang rasional (Hernández-Pando et al, 2022)

Gen *esx* bersifat dinamis, dan perubahan urutan kemungkinan menyebabkan variasi imun. Epitop sel T manusia dari MTB secara evolusioner sangat terkonservasi, ditandai dengan kurangnya variasi antigenik dan

penghindaran imun, namun terdapat polimorfisme yang ditemukan dalam urutan asam nukleat yang mengkode faktor virulensi signifikan, yang dapat mengubah antigen yang dihasilkan, dan juga dapat menyebabkan perubahan dalam fungsi, atau memungkinkan penghindaran imun. Polimorfisme genetik yang berbeda ini dapat memodulasi respon imun tubuh untuk mendukung infeksi TB dan perkembangan penyakit telah diidentifikasi (de Martino et al., 2019)

Melihat aktivitas imunodominan dari protein ESX dan pentingnya dalam pembentukan virulensi terhadap inang, ESAT-6 dan EsxH dianggap sebagai target potensial dalam pengobatan tuberkulosis (TB) (Aravindan, 2019). Hingga saat ini belum banyak data dan publikasi mengenai polimorfisme gen tersebut pada populasi *Mtb* di Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan. Diharapkan dengan adanya penelitian ini dapat memberikan informasi terbaru terkait variasi sekuens ESAT-6 dan EsxH sebagai antigen kandidat target untuk pengobatan tuberkulosis.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Apakah terdapat variasi sekuens DNA ESAT-6 dan EsxH dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan, Indonesia
- b. Apakah variasi sekuens DNA ESAT-6 dan EsxH dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* tersebut berpengaruh pada level asam amino?
- c. Apakah variasi tersebut terdapat pada sekuens strain atau lineage yang lain dan berpengaruh terhadap tingkat kekerabatan/filogenetik?

1.3 Tujuan Penelitian

- a. Tujuan Umum
Untuk mengetahui variasi sekuens DNA ESAT-6 dan EsxH dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan, Indonesia.
- b. Tujuan Khusus
 1. Mengidentifikasi keberadaan variasi sekuens DNA ESAT-6 dan EsxH dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan, Indonesia.
 2. Menganalisis pengaruh variasi sekuens DNA ESAT-6 dan EsxH terhadap level asam amino.
 3. Mengidentifikasi keberadaan variasi sekuens DNA ESAT-6 dan EsxH pada strain atau lineage yang lain dan hubungannya terhadap tingkat kekerabatan/filogenetik.

1.4 Manfaat Penelitian

a. Manfaat Akademik

Memberikan informasi terkait data baru mengenai variasi sekuens DNA ESAT-6 dan EsxH pada isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*.

b. Manfaat Klinis

Memberikan dasar pengetahuan yang lebih kuat untuk pengobatan TB yang lebih efektif dan adaptif terhadap variasi genetik *Mycobacterium tuberculosis*

c. Manfaat kepada Masyarakat

Memberikan informasi mengenai variasi genetik gen ESAT-6 dan EsxH yang dapat digunakan untuk pemantauan dan pengendalian penyakit tuberculosis

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC), Makassar dan Laboratorium Biomolekuler, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Hasanuddin, Makassar. Penelitian berlangsung selama 7 bulan (November 2023-Mei 2024).

2.2 Alat dan Bahan

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian, antara lain tabung eppendorf , PCR tube, Micropipette Tips 10 ul, 200 ul, 100 ul, 5 ml dan 10ml, rak tabung, pipet mikro 10ul, 20ul, 100ul dan 1000ul, timbangan digital, autoklaf, *microwave*, *laminar air flow cabinet*, mesin sentrifugasi, lemari pendingin, spektrofotometer, cawan petri *disposable*, spatula, labu Erlenmeyer 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, cawan kaca, gelas ukur 100 ml, gelas ukur 50 ml, tabung reaksi, aparatur elektroforesis gel agarosa, tabung mikro 1,5 ml, vorteks, *freezer -20 C*, ph meter, sentrifuge, dan peralatan laboratorium yang digunakan di Laboratorium HUMRC dan Laboratorium Biomolekuler LPPM Unhas.

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini yaitu: RNase, akuades, 10 mM dNTPs, enzim *Taq polymerase*, bubuk agarosa. SyberSafe, gene ruler 100 bp dan gene ruler 1 kb, gSYNC DNA extraction kit, sbadex pathogen nucleic acid purification kit, PCR High Fidelity Phusion Plus DNA Polymerase, Wash Buffer, etanol absolut, primer gen ESAT-6 dan EsxH:

Tabel 2.1 Sekuens Primer ESAT-6 dan EsxH

Primer	ESAT-6	EsxH
<i>Forward</i> <i>d</i> (5' → 3')	GCAATCCGGCGGCTCCACCAG (Yang et al., 2010)	GACCGCAACCAAAGAA C (Sukkhū and Yeshnee, 2015)
<i>Reverse</i> (5' → 3')	TCGGCCGCCATGACAACCTCT C (Yang et al., 2010)	CCAGCACCCACGGAAAG (Sukkhū and Yeshnee, 2015)
Panjang target PCR (bp)	946	951

2.3. Metode Penelitian

2.3.1 Kultivasi dan Isolasi DNA Genom

Sampel yang digunakan adalah 80 sampel klinis yang diperoleh dari Laboratorium HUMRC, Makassar. Kultivasi Mtb dilakukan menggunakan Löwenstein/Jensen media. Kultur Mtb kemudian digunakan untuk isolasi genom menggunakan gSYNC DNA extraction kit. Selanjutnya, setelah genome diekstraksi, lalu dilakukan purifikasi untai basa nukleotida menggunakan Sbeadex pathogen nucleic acid purification kit. DNA yang telah didapatkan selanjutnya akan dilanjutkan ke tahap PCR.

2.3.2 Amplifikasi Gen ESAT-6 dan EsxH Mycobacterium tuberculosis dengan PCR

Amplifikasi gen dengan enzim PCR High Fidelity Phusion Plus DNA Polymerase dilakukan dengan menggunakan primer spesifik untuk masing-masing gen. Optimasi suhu annealing dilakukan terlebih dahulu untuk reaksi PCR menggunakan DNA genom *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. Secara keseluruhan, kondisi PCR dapat dilihat pada tabel 2.2. Kondisi PCR yang dilakukan adalah denaturasi awal pada suhu 95° C selama 1 menit. Selanjutnya siklus PCR dilakukan sebanyak 35 kali, dimulai dengan denaturasi pada suhu 95° C selama 15 detik, annealing pada suhu berbeda yaitu 65°C dan 55°C, selama 30 detik dan 15 detik, extension pada suhu 72° C selama 15 detik-20 detik, siklus PCR dilanjutkan dengan tahap final extension pada suhu 72° C selama 7 menit-2 menit dan penurunan suhu menjadi 4° C.

Tabel 2.2 Kondisi PCR

Step	Temp.		Time		Siklus
	ESAT-6	EsxH	ESAT-6	EsxH	
Initial Denaturation	95°C		1 menit		1
Denaturation	95°C		15 detik		35
Annealing	65°C	55°C	30 detik	15 detik	
Extension	72°C		15 detik	20 detik	
Final Extension	72°C		7 menit	2 menit	1
	4°C		Hold		Hold

Komponen dan volume reaksi PCR yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 2.3. Nuclease Free Water dan template DNA H37Rv *M. tuberculosis* digunakan sebagai kontrol negative dan kontrol positif dalam reaksi PCR sebanyak 12µl.

Semua komponen reaksi dimasukkan ke dalam tabung PCR. Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan dalam mesin *thermal cycle*. Selanjutnya produk PCR diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa.

Tabel 2.3 Mix Reaksi PCR

Bahan	Volume μ l
Enzim Redmix	25
Forward Primer EsxH dan ESAT-6	2
Reverse Primer EsxH dan ESAT-6	2
Nuclease Free Water	9
Sampel	12
Total Reaksi	50

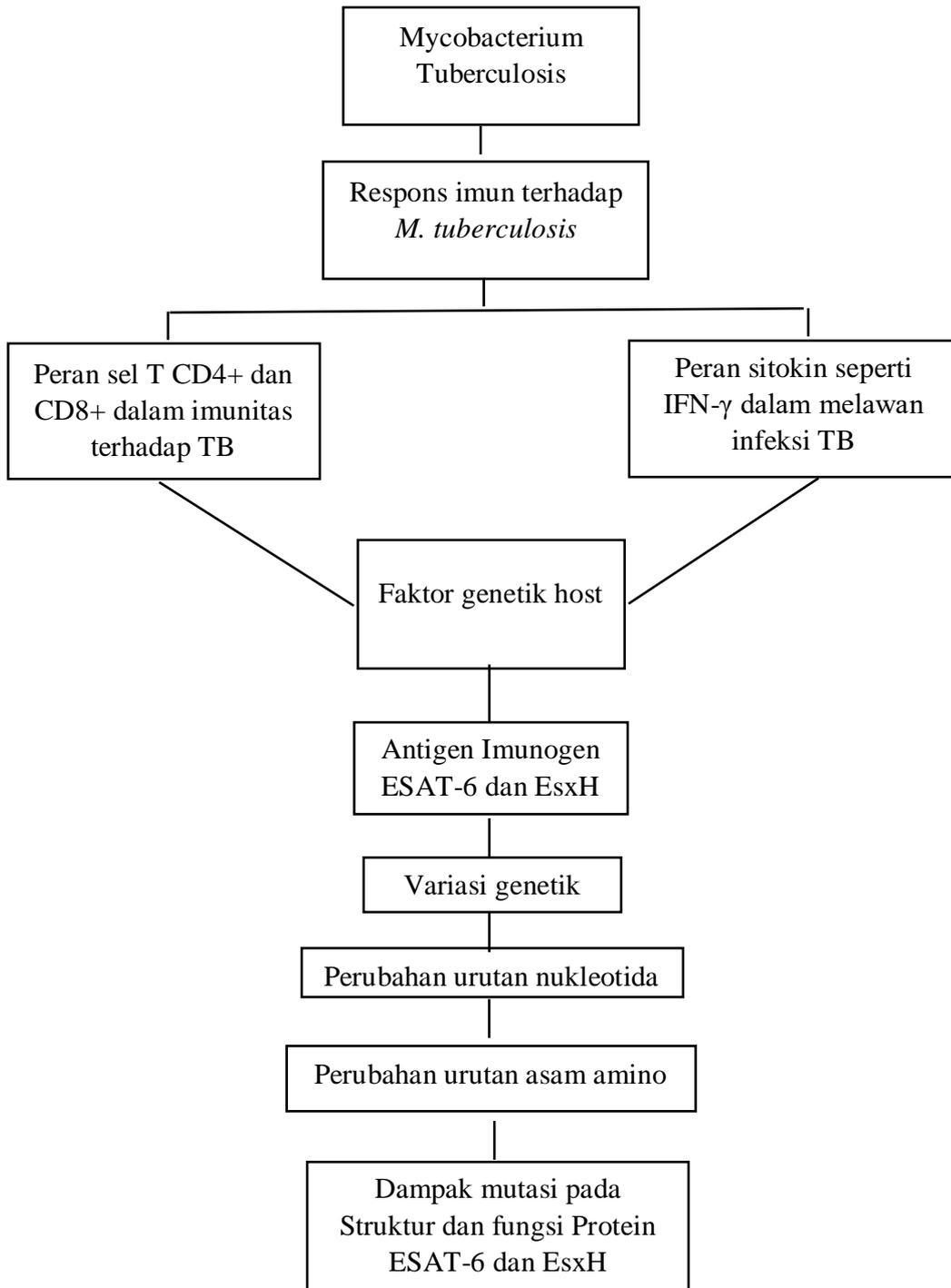
2.3.3 Elektroforesis

Setelah proses amplifikasi, dilanjutkan dengan elektroforesis menggunakan Gel agarose 1%, dengan gene ruler 100 bp plus untuk pembacaan hasil. Gel garose dibuat dengan melarutkan 1 gr agarosa pada 100 ml larutan 0,5X TAE *buffer* dalam botol, kemudian dipanaskan selama 2 menit di microwave. Setelah suhu turun, SybrSafe DNA Gel Stain diberikan sebanyak 4 μ l ke dalam larutan, homogenkan lalu dituang ke dalam cetakan. Setelah gel mengeras, cetakan sisir gel diangkat dan diletakkan di dalam *electrophoresis chamber* yang berisi 0,5X TAE *buffer*. Sebanyak 1 μ l DNA ladder 100kb atau 1 μ l produk PCR dimasukkan ke dalam sumuran gel. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 80 volt selama 60 menit. Hasil diamati di bawah sinar UV yang akan memendarkan pita DNA.

2.3.4 Sekuensing

Sekuensing hasil PCR dilakukan dengan metode Sanger DNA sequencing. Masing-masing sampel dari PCR kemudian dikirim sebanya 50 μ l dikirim ke Genetika Sains Indonesia untuk hasil sequencing.

2.11 Kerangka Teori



2.12 Kerangka Konsep

