

POLIMERASE CHAIN REACTION

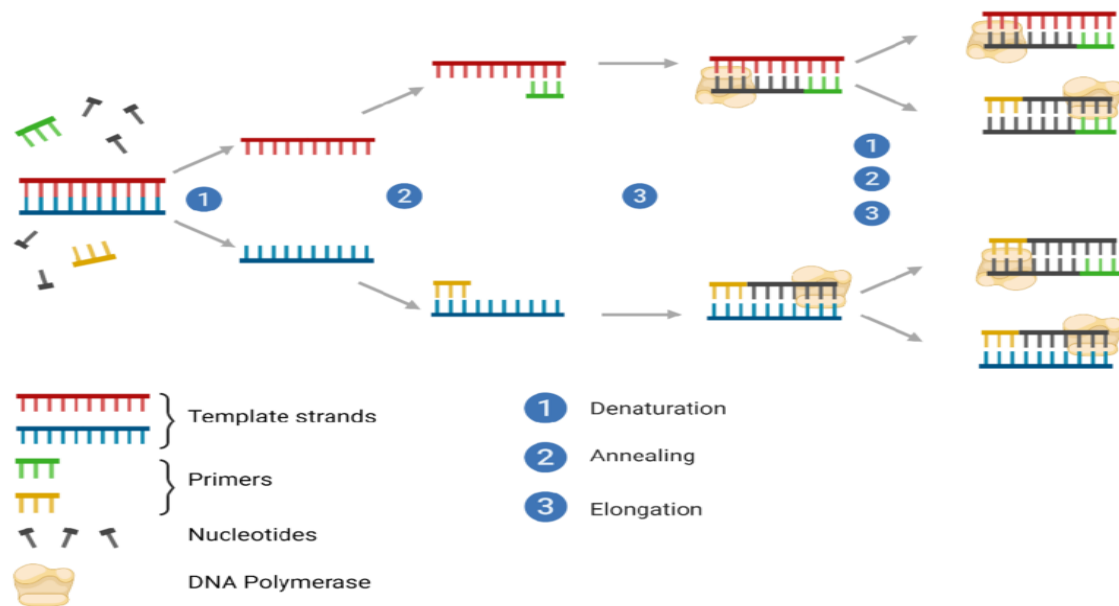
A. Tujuan Pembelajaran

Setelah mempelajari materi ini, mahasiswa diharapkan dapat:

1. Menjelaskan Pengertian dan prinsip kerja PCR
2. Membedakan jenis-jenis PCR berdasarkan fungsinya
3. Menjelaskan tahapan PCR dengan benar
4. Melakukan prosedur praktikum PCR
5. Menggandakan DNA target dengan PCR secara virtual
6. Menganalisis hasil PCR

B. Pengertian PCR

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. PCR ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari 1olymera yang terdapat dalam 1polymera klinik. Enzim DNA 1polimerase merupakan enzim termotabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer 1olyme proses pemanjangan dan ion magnesium menstimulasi aktivasi 1olymere.



Gambar 1 Penggandaan DNA Melalui PCR

C. Jenis-Jenis PCR

Tenik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya:

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan DNA.
2. Inverse-PCR, metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template diganti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi "sekuen antara" dari beragam gen.
3. Nested-PCR, proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut primer inner disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai outer primer. Pada prakteknya, reaksi pertama dari PCR menggunakan outer primer, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan inner primer atau nested primer menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. Nested primer akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama.
4. Quantitative-PCR; digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas, dimulai dari jumlah DNA, cDNA, atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel
5. Reverse Transcriptase (RT-PCR); metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh reverse transcriptase (mengubah RNA menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan.
6. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini dikembangkan oleh Welsh and Mc Clelland (1990) dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer – primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom.

D. Tahapan Penting dalam PCR

Dalam PCR ada beberapa tahapan penting yang perlu diperhatikan, tahapan tersebut sebagai berikut:

1. Denaturasi (perusakan sel;
Denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara

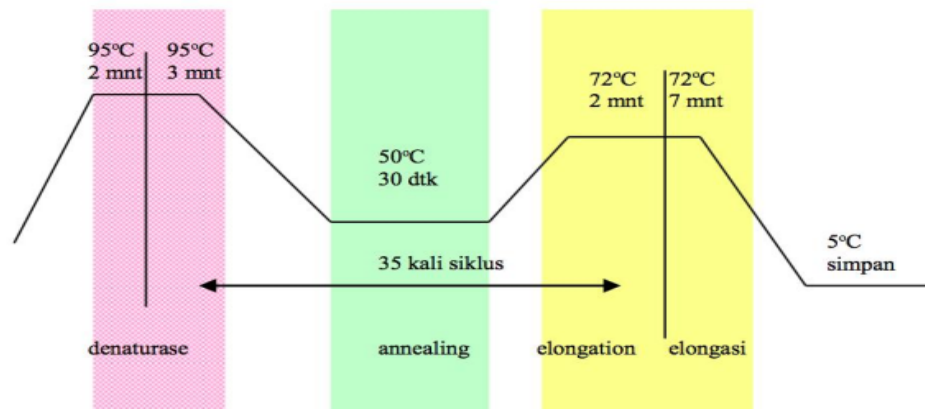
cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C.

2. Annealing (Penempelan Primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.

3. Extension (Pemanjangan Primer)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.



Gambar 2 Tahapan Kegiatan PCR

E. Latihan

Jawablah soal berikut ini

1. Jelaskan pengertian dan prinsip kerja PCR!
2. Buatlah tabel persamaan dan perbedaan dari jenis-jenis PCR
3. Jelaskan 3 tahapan penting dalam PCR beserta gambarnya.
4. Buatlah dua siklus skema dari hasil PCR yang menunjukkan masing-masing tahapan!

5. Mengapa PCR sangat penting dalam bioteknologi molekuler? Jelaskan!

DAFTAR PUSTAKA

- Caulfield, T., et al. (2006). The effects of business practices... *Journal of Biomedical Discovery and Collaboration*, 1, 7.
- Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–1557.
- Chou, Q., et al. (1992). Hot-start PCR via wax barrier. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1717–1723.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Heid, C. A., et al. (1996). Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986–994.
- Higuchi, R., et al. (1993). Real-time monitoring (ethidium bromide/CCD). *Nature Biotechnology*, 11, 1026–1030.
- Hindson, B. J., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610.
- Holland, P. M., et al. (1991). Detection of specific PCR product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Taq* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276–7280.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., & Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227(4691), 1229–1231. <https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229>
- ISAAA. (2018). *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2018* (ISAAA Brief No. 54). International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907.
- Kellogg, D. E., et al. (1994). Antibody-mediated hot-start PCR. *BioTechniques*, 16(6), 1134–1137.
- Kinosita, K., & Tsong, T. Y. (1977). Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 471(2), 227–242.
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., & Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal*, 10(1), 165–174. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010165.x>
- Lundberg, K. S., et al. (1991). High-fidelity amplification using *Pfu* DNA polymerase. *Gene*, 108, 1–6.
- Mattila, P., et al. (1991). Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent). *Nucleic Acids Research*, 19(18), 4967–4973.
- Mir, L. M., Gehl, J., Sersa, G., Collins, C. G., Garbay, J. R., Billard, V., ... Marty, M. (1998). Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator. *European Journal of Cancer Supplements*, 4(11), 14–25.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NobelPrize.org. (1993). *The Nobel Prize in Chemistry 1993—Official summary*. Nobel Prize Outreach.
- Saiki, R. K., et al. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354.
- Saiki, R. K., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *PCR thermal cyclers—Education page*. Thermo Fisher Scientific.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 9236–9241.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303–305. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.303>
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23(1), 11–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00808.x>