

PRINSIP-PRINSIP POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DAN APLIKASINYA

Any Aryani, Diah Kusumawaty
Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi UPI

Dewasa ini, perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang bioteknologi dan biologi molekuler berlangsung sangat pesat. Berawal dari terungkapnya struktur dan fungsi DNA (*Deoxyribonucleic acid*) oleh Francis Crick pada tahun 1958, kemudian disusul dengan ditemukannya enzim restriksi, pembuatan pustaka gen berdasarkan situs restriksi, cloning sekuen DNA pada organisme prokaryot, penggunaan berbagai macam penanda DNA (*DNA marker*) sampai akhirnya sintesis dan penggandaan DNA secara *in vitro* serta sekuen genom dan analisisnya.

Pada tahun 1985, Kary Mullis menemukan suatu teknik yang mampu mensintesis dan menggandakan DNA secara *in vitro* dalam waktu relatif singkat dengan bantuan enzim *DNA polymerase* dan beberapa bahan pokok lainnya. Teknik ini dinamakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Berkat karyanya tersebut, Kary Mullis mendapatkan hadiah Nobel dalam bidang Kimia pada tahun 1993.

Sintesis dan penggandaan DNA dengan PCR ini berlangsung di luar sel organisme, tepatnya dalam suatu "mesin PCR". Pada dasarnya prinsip yang terjadi dalam sintesis DNA tersebut sama dengan proses replikasi DNA terjadi di dalam sel (*in vivo*). Anda masih ingat bukan proses replikasi DNA, terutama yang terjadi pada utas DNA: *leading strand* dan *lagging strand*?

Dalam proses PCR. materi pokok berupa DNA utas ganda hasil isolasi dari suatu organisme, diantaranya direaksikan dengan : enzim *DNA polymerase*, *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), $MgCl_2$, dan *primer* (potongan pendek DNA utas tunggal, yang mengawali sintesis DNA). Setelah larutan *mix PCR* tersebut homogen, larutan itu siap direaksikan dalam "mesin PCR".

Dalam "mesin PCR", terjadi proses sintesis dan penggandaan DNA yang terdiri dari tiga tahap : *Denaturation*, *Annealing* dan *Extension*. Pada jaman dahulu, sebelum dibuat "mesin PCR" yang canggih seperti sekarang ini (lihat gambar), "mesin PCR" yang ada merupakan rangkaian alat sederhana, yakni berupa tiga buah inkubator yang suhunya diatur sedemikian rupa, sehingga mendekati kondisi yang diinginkan: *Denaturation*, *Annealing* dan *Extension*).

Rincian dari masing-masing tahap tersebut adalah sebagai berikut :

1. Pada tahap *denaturation*, reaksi PCR terjadi pada suhu tinggi ($\pm 94^{\circ}C$) sehingga DNA utas ganda terdenaturasi atau terpisah menjadi dua utas tunggal.
2. Tahap awal sintesis sekuen spesifik DNA secara *in vitro* dimulai pada tahap *annealing*, dimana *primer* akan menempel pada sekuen komplementer utas tunggal DNA cetakan (*DNA template*). Sintesis DNA ini berlangsung dari arah 5' ke 3'. Agar sintesis DNA dapat berlangsung dengan baik maka dalam reaksi tersebut diperlukan adanya enzim *DNA polymerase*, misalnya *Taq*


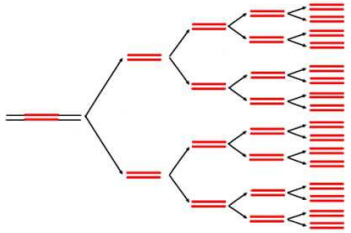
(*Thermus aquaticus*) polymerase dan $MgCl_2$, sementara kebutuhan energi dan nukleotida terpenuhi dari dNTPs (terdiri dari : dTTP, dGTP, dATP dan dCTP). Reaksi sintesis DNA pada tahap ini tergantung pada suhu *annealing* dari *primer* yang digunakan. Suhu *annealing primer* tersebut ditentukan diantaranya dari ukuran panjang *primer* dan kandungan basa (G+C) dari *primer* yang digunakan. Misalnya *primer* yang terdiri dari 24-30 pasang basa, dapat bekerja dengan baik pada suhu *annealing* $60^{\circ}C$ atau lebih.

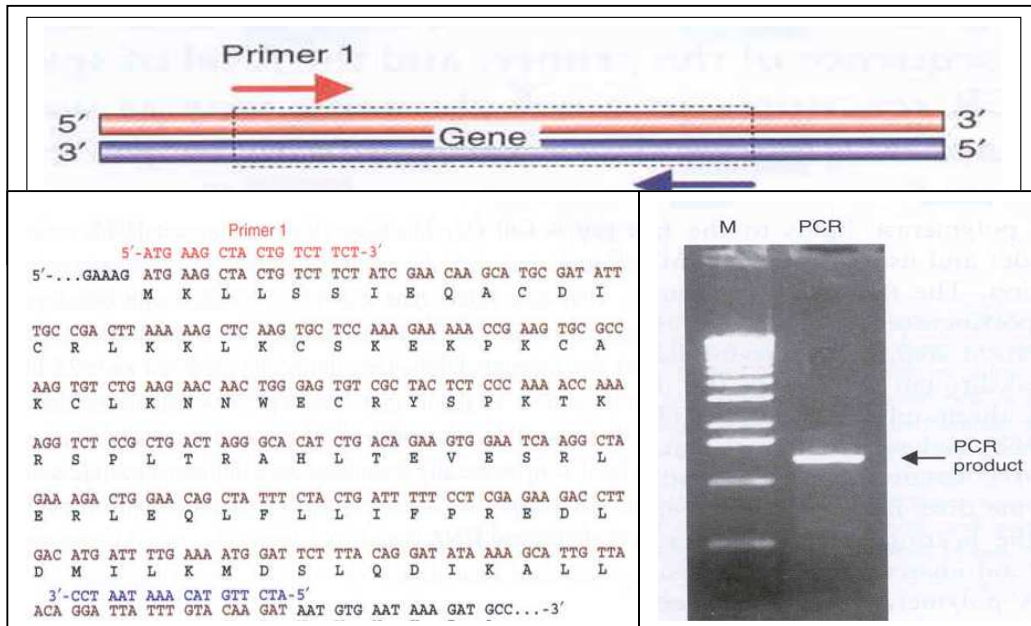
3. Pada tahap extension, umumnya terjadi pada suhu $72^{\circ}C$, proses sintesis yang telah dimulai dari tempat penempelan *primer*, terus berlanjut sampai bertemu dengan sintesis DNA yang dilakukan oleh *primer* lainnya dengan arah yang berlawanan pada komplemen utas DNA *template*, sehingga terbentuklah DNA utas ganda yang baru.

Sintesis DNA tersebut akan terus berlanjut melalui ketiga tahapan tersebut di atas secara berulang. Pada akhirnya maka akan diperoleh produk PCR, berupa sekuen DNA yang diinginkan dalam jumlah yang berlipat ganda, yakni sebanyak 2^n (n = banyaknya siklus PCR yang digunakan). Selanjutnya, produk PCR yang diperoleh dapat disimpan pada suhu $4^{\circ}C$, sampai saatnya tiba untuk dianalisis lebih lanjut.

Untuk melihat hasil amplifikasi DNA tersebut, maka produk PCR yang diperoleh dimigrasikan pada gel agarose (elektroforesis). Umumnya, hasil amplifikasi DNA dengan PCR ini dipengaruhi beberapa faktor, yaitu : kualitas dan kuantitas DNA, temperatur *annealing primer*, kualitas dan konsentrasi *primer*, konsentrasi $MgCl_2$, dNTP, enzim *DNA polymerase*, dan jumlah siklus PCR yang digunakan.

Teknik PCR dapat diaplikasikan diantaranya untuk : Isolasi dan penggandaan fragmen DNA dari gen tertentu, penggandaan DNA untuk cloning, penggandaan cDNA, diagnosa kelainan genetik, infeksi penyakit, jenis kelamin, penggunaan marker DNA dan merupakan tahapan kerja dalam sekuensing. Oleh sebab itu, teknik PCR ini dapat dimanfaatkan dalam bidang-bidang : Biologi Molekuler dan Bioteknologi, Pertanian, Kehutanan, Peternakan, Perikanan Kelautan, Kedokteran, Industri dan Lingkungan.

<p>Contoh Formula Larutan Mix PCR (1 tube) :</p> <p>Air (ddH₂O) = 35.75 μl 10x Buffer PCR = 5.00 μl MgCl₂ = 2.00 μl dNTP mix = 1.00 μl Primer 1 = 2.00 μl Primer 2 = 2.00 μl DNA sampel = 2.00 μl Taq polymerase = 0.25 μl</p>	<p>Contoh Kondisi PCR :</p> <p>Awal : $94^{\circ}C$, 1 menit <i>Denaturation</i> : $94^{\circ}C$, 30 detik - <i>Annealing</i> : $60^{\circ}C$, 30 detik - 35 Siklus <i>Extension</i> : $72^{\circ}C$, 30 detik - Akhir : $72^{\circ}C$, 2 menit *Penyimpanan: $4^{\circ}C$ (Kulkas)</p>
	 <p>Sintesis dan Penggandaan DNA (Jumlah DNA = 2^n; n = siklus)</p>

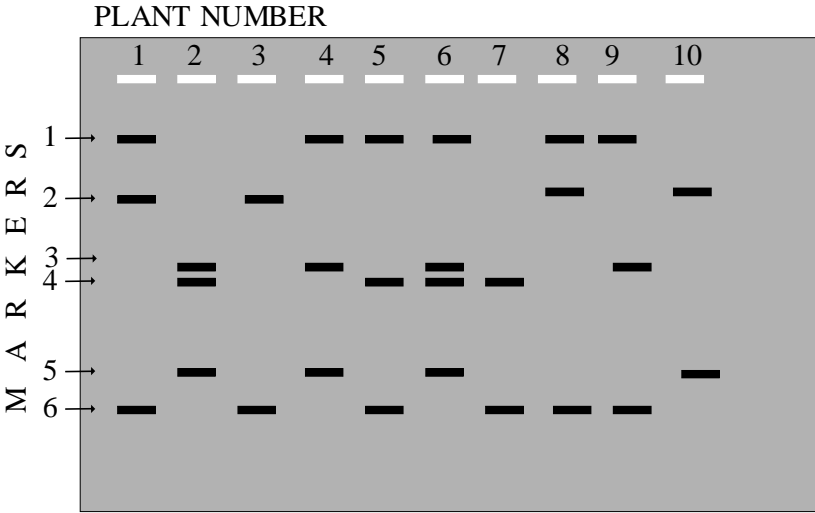


Gambar 20.1. Contoh formula, kondisi, mesin dan prinsip kerja serta visualisasi hasil

1. Persilangan dua spesies tanaman tomat menghasilkan keturunan F2 sebanyak sepuluh tanaman tomat yang berbeda sifat. Perbedaan sifat yang dianalisis meliputi : resistensi terhadap serangga, warna daun, kadar *Lycopene*, resistensi terhadap jamur, tinggi tanaman dan kandungan *Quercitine*. Diketahui bahwa semua sifat tersebut berasal dari perbedaan sifat diantara kedua induk yang dikendalikan oleh satu gen.

	Nomor Tanaman									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Resistensi terhadap serangga	√			√		√		√	√	
Warna daun	√		√		√	√	√			
Kadar <i>Lycopene</i>		√			√	√	√			
Resistensi terhadap jamur		√	√	√		√			√	
Tinggi tanaman		√				√			√	√
Kandungan <i>Quercitine</i>		√		√		√				√

Untuk meningkatkan usaha agrobisnis tanaman tomat, maka dilakukan penelitian untuk mencari DNA marker yang berhubungan dengan sifat tanaman. Setelah dilakukan analisis DNA dengan menggunakan DNA marker dihasilkan data sebagai berikut :



Tentukan DNA marker manakah yang anda anggap paling baik (spesifik) untuk sifat tanaman tomat tersebut, dan jelaskan alasannya.