

**BUKU AJAR**

# **TEKNIK-TEKNIK DASAR BIOTEKNOLOGI**

**Tim Penyusun:**

**Ir. Suprayogi, M.Sc., Ph.D.**

**Dr. Ir. Noor Farid, M.Si.**

**Prita Sari Dewi, S.P., M.Sc., Ph.D.**

**Sapto Nugroho, S.Si., M.Biotech.**

**Dyah Susanti, S.P., M.P.**



**Penerbit**

**Universitas Jenderal Soedirman**

**2021**

**BUKU AJAR**

**TEKNIK-TEKNIK DASAR BIOTEKNOLOGI**

© 2021 Universitas Jenderal Soedirman

**Cetakan Kesatu, November 2021**  
Hak Cipta dilindungi Undang-undang  
*All Right Reserved*

**Penulis:**

Ir. Suprayogi, M.Sc., Ph.D.  
Dr. Ir. Noor Farid, M.Si.  
Prita Sari Dewi, S.P., M.Sc., Ph.D.  
Sapto Nugroho, S.Si., M.Biotech.  
Dyah Susanti, S.P., M.P.

**Editor Isi:**

Ir. Budi Prakoso, M.Sc. D.Tech.Sc

**Editor Bahasa:**

Kristianto Setiawan, SS., M.A

**Diterbitkan oleh:**

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN  
Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)  
Telp. (0281) 626070  
Email: [unsoedpresspwt@gmail.com](mailto:unsoedpresspwt@gmail.com)



Anggota  
**Afiliasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia**  
Nomor : 003.027.1.03.2018

viii + 111 hal., 15 x 23 cm

**ISBN: 978-623-6783-75-7**

*Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari penerbit, sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak, photoprint, microfilm dan sebagainya.*

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah robbil'alamin, atas ridlo Allah SWT dan atas dukungan banyak pihak Buku Ajar "Teknik-teknik Dasar Bioteknologi" ini dapat diselesaikan. Penulisan buku ajar ini disusun sebagai materi kuliah pada Mata Kuliah Rekayasa Genetika Tanaman atau mata kuliah Bioteknologi Pertanian. Penulisan buku ini juga didasari oleh pemikiran bahwa pada era millennium ini Bioteknologi mempunyai peran yang sangat penting sebagai salah satu *leading and frontier technology*. Bioteknologi tidak hanya penting untuk mereka yang bekerja di bidang ilmu biologi, pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan, lingkungan dan kedokteran, tetapi juga untuk mereka yang bekerja di bidang lain, seperti ilmu bioteknologi forensik. Mendasarkan pada hal tersebut dan mempertimbangkan sumberdaya yang ada di Laboratorium Pemuliaan Tanaman dan Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Unsoed, maka kami tergerak untuk menulis buku yang dapat dijadikan sebagai buku ajar dan panduan teknis laboratorium untuk mengenalkan teknik-teknik dasar yang harus dikuasai oleh mereka yang bekerja dalam bidang Bioteknologi Pertanian.

Atas tersusun dan terbitnya buku ini kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Kristianto Setiawan, S.S, M.A. yang telah membantu penyuntingan Bahasa, Budi Prakoso, Dr.Tech.Sc. yang telah melakukan penyuntingan isi dan Eka Oktaviani, S.Si., M.Biotech. yang telah membantu membuat glossary. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Rektor Unsoed yang telah memberikan dana hibah penulisan buku ajar, dan Ketua Lembaga Pengembangan Pembelajaran dan Penjaminan Mutu (LP3M) Unsoed yang telah membantu penerbitan buku ajar ini.

Purwokerto, Oktober 2021

Penulis



# DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL .....	i
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
I.    PENDAHULUAN .....	1
II.   ISOLASI DNA .....	9
III.  METODE PENGUKURAN KUANTITAS DAN KUALITAS DNA .....	15
IV.  POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) .....	23
V.   PEMOTONGAN DNA DENGAN ENZIM RESTRIKSI ENDONUKLEASE DAN ISOLASI PLASMID .....	33
VI.  DESAIN PRIMER .....	49
VII. MARKA MOLEKULER DAN SELEKSI BERBASIS MARKA .....	63
VIII. ANALISIS FILOGENETIK .....	73
KISI-KISI JAWABAN SOAL LATIHAN .....	78
GLOSARIUM .....	85
INDEKS .....	109

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Penghitungan penambahan ammonium asetat dan isopropanol berdasarkan volume DNA yang diambil pada <i>aqueous phase</i> .....	13
3.1. Tabel pembacaan hasil spektrofotometri .....	15
4.1. Sifat beberapa enzim DNA polimerase <i>thermostable</i> .....	25
5.1. Enzim restriksi dan daerah pemotongannya (Nicholl, 2008)	36
5.2. Contoh plasmid dan karakteristik yang dimiliki .....	42
5.3. Beberapa contoh plasmid yang digunakan dalam teknik biologi molekuler .....	44
6.1. <i>Melting temperature</i> yang dihitung dengan Rumus Wallace untuk panjang primer yang berbeda, dengan asumsi 50% GC .....	52

# DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1.1. Struktur sel hewan dan tumbuhan tingkat tinggi (sel eukariot) .....	2
1.2. Struktur sel bakteri (sel prokariot) .....	3
1.3. Struktur DNA untai ganda dan komponen penyusunnya ....	5
2.1. Hasil ekstraksi fenol berupa tiga lapisan dari atas ke bawah yaitu lapisan DNA, lapisan protein dan lapisan fenol (Dale dan Schantz, 2003) .....	10
2.2. Presipitasi DNA dengan isopropanol atau ethanol (Dale dan Schantz, 2003) .....	10
2.3. Tahap-tahap isolasi DNA dengan metode konvensional (Sumber: Rajendrakumar <i>et al.</i> (2006) .....	11
2.4. Tahap-tahap isolasi DNA dengan menggunakan <i>kit</i> isolasi DNA (Bioneer, 2013) .....	11
3.1. Hasil elektroforesis pada gel (Reece, 2004) .....	16
3.2. Penempelan EtBr pada DNA (Reece, 2004) .....	17
3.3. Cara menentukan konsentrasi DNA genomik dengan melihat ketebalan pita DNA dibandingkan dengan DNA ladder yang sudah diketahui konsentrasinya (Sumber: Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis. De Join Genome Institute, USA) .....	19
3.4. DNA genomik yang terkontaminasi oleh RNA dan yang telah terdegradasi (Sumber: Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis. De Join Genome Institute, USA) .....	20
3.5. DNA genomik yang tidak murni (impurities) (Sumber: Genomic DNA QC Using Standard Gel Electrophoresis. De Join Genome Institute, USA) .....	20
4.1. Ilustrasi penempelan primer oligonukleotida (P) pada DNA cetakan .....	26
4.2. Struktur <i>deoxy ribose triphosphates (dNTPs)</i> . Kandungan basa nitrogennya dapat A (dATP), T (dTTP), G (dGTP) atau C (dCTP) .....	26
4.3. Tahap dalam setiap siklus PCR .....	28
4.4. Peningkatan eksponensial jumlah kopi DNA selama berlangsungnya PCR .....	29

5.1.	Daerah pengenalan <i>EcoRI</i> pada DNA utas ganda. (a) DNA sebelum dipotong, (b) DNA setelah dipotong dengan enzim restriksi <i>EcoRI</i> .....	35
5.2.	Bentuk-bentuk ujung DNA hasil pemotongan enzim restriksi endonuklease (Nicholl, 2008) .....	37
5.3.	Peta plasmid pUC19 dengan daerah pengenalan enzim restriksi yang terkandung .....	38
5.4.	Komposisi pemotongan plasmid pGEM <sup>®</sup> -T dengan <i>BamHI</i> dan <i>EcoRI</i> (Hadi, 2004) .....	39
5.5.	Komposisi pemotongan plasmid pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> dengan <i>NcoI</i> dan <i>XhoRI</i> (Hadi, 2011) .....	40
5.6.	Komposisi pemotongan plasmid pUC19 dengan <i>EcoRI</i> .....	40
5.7.	Sel bakteri dengan DNA kromosom (1) dan plasmid (2) ( <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid">http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid</a> ) .....	41
5.8.	Peta plasmid pBR322 yang menunjukkan adanya gen resisten terhadap antibiotika ampisilin (Ap <sup>r</sup> ) dan tetrasiklin (Tet <sup>r</sup> ), titik ori, dan beberapa daerah pengenalan enzim restriksi. b) Peta plasmid pUC18 yang mengandung gen resisten ampisilin (Ap <sup>r</sup> ), gen <i>lacZ</i> , dan sepuluh daerah restriksi ( <i>EcoRI</i> , <i>SstI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>XbaI</i> , <i>SolI</i> , <i>PstI</i> , <i>SphI</i> , <i>HindIII</i> ) (Lodge, 2007) .....	42
6.1.	Kesesuaian Primer dan DNA template memungkinkan terjadinya annealing .....	49
6.2.	Kedua primer oligonukleotida yang saling menempel .....	53
6.3.	Kesesuaian ( <i>complementarity</i> ) basa N pada primer yang dapat menyebabkan terbentuknya hairpin dan self-dimer ....	54
6.4.	Contoh-contoh menempelnya primer pada DNA cetakan ....	55
7.1.	Penggunaan RFLP untuk membedakan DNA sekuen antara tanaman tahan (tidak mengalami mutasi gen) dan peka (mengalami mutasi gen, kehilangan salah satu <i>restriction site</i> ) .....	65
7.2.	Pola pita DNA marka RAPD. P1 = tetua 1, P2 = tetua 2, F1 = Hybrid, F7 = generasi ke 7. (Perhatikan pola dominan dan resesif pada pita DNA) .....	66
7.3.	Pola pita DNA marka mikrosatelit ( <i>Simple Sequence Repeat</i> ). (Perhatikan pola dominan dan resesifnya pada pita DNA) .....	67
7.4.	Pola pita DNA AFLP. (Perhatikan pola dominan dan resesifnya pada pita DNA) .....	68

# IV. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

(Sapto Nugroho Hadi, S.Si., M. Biotech.)

---

## Capaian Pembelajaran:

Setelah menyelesaikan bab ini, mahasiswa mampu menjelaskan teori dasar amplifikasi DNA menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

## Kompetensi Khusus:

Pada akhir kuliah mahasiswa dapat:

1. menjelaskan prinsip dasar amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR
  2. melakukan PCR dan *trouble shooting* reaksi PCR.
- 

## A. Pengantar

*Polymerase chain Reaction* (PCR) secara bahasa diartikan sebagai reaksi berantai yang melibatkan aktivitas enzim DNA polimerase. Namun secara istilah PCR diterjemahkan sebagai suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) sekuen asam nukleat secara *in vitro* (di dalam tabung) menggunakan polimerisasi berulang dari sekuen DNA, yang melibatkan kerja enzim DNA polimerase. Dapat juga dikatakan, PCR merupakan teknik untuk menduplikasi asam nukleat secara *in vitro* (di luar sel tubuh). Asam nukleat yang diduplikasi dijadikan cetakan untuk pembuatan asam nukleat duplikatnya.

Teknik PCR adalah teknik tertua jika dilihat dari kacamata teoritis dibandingkan teknik kloning dan sekuensing DNA dalam perkembangan biologi molekuler modern. Namun secara praktik, PCR menjadi teknik yang paling sering digunakan dan lebih luas pemakaiannya (serba guna) dibandingkan kloning dan sekuensing (Sambrook dan Russel, 2001).

Metode PCR pertama kali diusulkan oleh H. Ghoind Khorana dan kolega pada awal tahun 1970 sebagai suatu strategi untuk sintesis kimia gen di laboratorium. Namun belum adanya komponen pendukung seperti ketersediaan enzim DNA polimerase *thermosable*, metode untuk sintesis primer oligonukleotida, ataupun sekuen gen yang berhasil disekuensing

menjadikan usulan Khorana sulit diwujudkan saat itu. Bahkan kemudian ide Khorana sangat cepat terlupakan. Baru kemudian di tahun 1985, secara independen ide sintesis kimia gen di laboratorium dikemukakan kembali oleh Kary Mullis. Mullis dan kolega berhasil mempraktekkan amplifikasi *in vitro* gen mamalia *single-copy* menggunakan fragmen Klenow (fragmen protein berukuran besar) enzim DNA polimerase I dari *Escherichia coli* (Sambrook dan Russel, 2001).

Enzim yang digunakan Mullis memiliki kelemahan, yaitu tidak tahan terhadap suhu tinggi (suhu yang digunakan untuk memisahkan utas ganda DNA menjadi tunggal pada tahap pertama teknik PCR), sehingga keaktifan enzim saat proses pemanjangan DNA menjadi hilang. Untuk mengatasi permasalahan ini, enzim ditambahkan pada setiap tahap PCR, terutama menjelang tahap pemanjangan DNA dengan terlebih dahulu menurunkan suhu hingga 37°C. Namun, proses PCR berjalan menjadi lebih lambat dan cenderung meningkatkan peluang terjadinya kesalahan.

Permasalahan yang timbul pada aplikasi teknik PCR oleh Kary Mullis terpecahkan ketika Saiki dan kolega berhasil memodifikasi teknik PCR dengan mengganti fragmen Klenow DNA polimerase I dari *E. coli* dengan enzim DNA polimerase yang diisolasi pertama kali dari mikroorganisme *Thermophilus eubacterium Thermus Aquaticus* galur YT1 pada 1976. Enzim pengganti ini bersifat *thermostable* sehingga tidak terdenaturasi pada fase awal reaksi PCR dan karenanya enzim tidak perlu ditambahkan pada setiap siklus PCR. Selain menghemat, modifikasi metode PCR oleh Saiki membuat proses PCR dapat berjalan lebih cepat, mudah diotomatisasi, dan mengurangi kemungkinan timbulnya kesalahan (Saiki *et al.*, 1988).

Dalam prakteknya, terdapat beberapa komponen penting yang harus ada dalam teknik PCR:

1. Enzim DNA polimerase *thermostable*
2. Sepasang primer oligonukleotida
3. Molekul *deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)*.
4. Kation monovalen ( $K^+$ ) dan divalen ( $Mg^{2+}$ )
5. Larutan buffer
6. DNA cetakan (*template*)

### **1. Enzim DNA Polimerase *thermostable***

Enzim DNA polimerase *thermostable* berperan dalam mengkatalisis sintesis utas baru DNA. Enzim ini bekerja sesuai DNA cetakan yang dijadikan target dan memerlukan primer oligonukleotida untuk mengawali proses sintesis DNA. Kemampuannya yang tahan terhadap suhu tinggi, enzim ini tetap aktif meskipun dalam PCR ada tahap pendenaturasian DNA cetakan dengan suhu tinggi (>95°C). Enzim ini sendiri bekerja optimum pada suhu sekitar 75-80°C.

Enzim DNA polimerase *thermostable* diisolasi dari organisme termofilik keluarga Archaea, yaitu *Thermus aquaticus*. Enzim *Taq* (*T. Aquaticus*) DNA polimerase merupakan enzim pertama yang berhasil diisolasi dan paling luas dipahami serta diaplikasikan dalam teknik PCR di banyak laboratorium, terutama untuk amplifikasi segmen DNA berukuran pendek. Sementara untuk amplifikasi DNA dengan panjang mencapai ribuan basa atau ketika diperlukan kloning mRNA dengan reverse transcriptase-PCR (RT-PCR), enzim thermostabil lain mungkin menjadi pilihan karena beberapa kelebihan yang dimiliki (Tabel 4.1). Namun pada prinsipnya pemilihan enzim ditentukan oleh tujuan riset yang dilakukan (Sambrook dan Russel, 2001).

Tabel 4.1. Sifat beberapa enzim DNA polimerase *thermostable*.

Organisme Asal	<i>Taq</i> ( <i>Thermus aquaticus</i> )	<i>Tfl</i> ( <i>Thermus flavus</i> )	<i>Tth</i> ( <i>Thermus thermophilus</i> )	<i>Tli</i> ( <i>Thermococcus litoralis</i> )	<i>Pfu</i> ( <i>Pyrococcus furiosus</i> )
Bobot Molekul (MW)	80 kDa	94 kDa	94 kDa	90 kDa	92 kDa
Suhu Optimum	75-80 °C	70 °C	75-80 °C	70-80 °C	72-78 °C
Aktivitas Eksonuklease 5'--> 3'	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak
Aktivitas Eksonuklease 3'--> 5'	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Ya
Aktivitas <i>Reverse Transcriptase</i>	Lemah	Ya	Ya	Tidak	N/A
Fidelity	Rendah	Rendah	Rendah	Rendah	Tinggi
Kestabilan (dalam menit pada suhu spesifik)	9 Menit pada 97.5 °C	120 Menit pada 70 °C	20 Menit pada 95 °C	100 Menit pada 100 °C	240 Menit pada 95 °C
Ujung Produk PCR	3'-A	3'-A	3'-A	70% Tumpul ( <i>Blunt</i> ); 30% basa tunggal menggantung ( <i>overhangs</i> )	<i>Blunt</i>

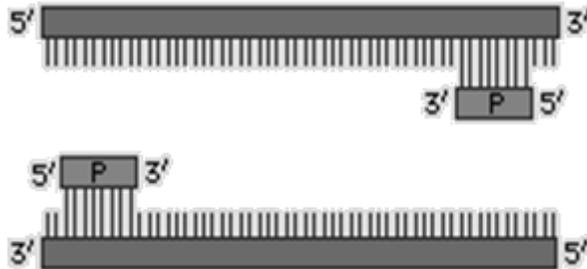
(Dari berbagai sumber).

## 2. Primer Oligonukleotida

Dalam bekerja mengkatalisis, enzim DNA polimerase membutuhkan sekuen oligonukleotida pendek di bagian ujung sekuen DNA. Enzim DNA polimerase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara sekuen oligonukleotida pendek dan molekul *deoxy*

*nucleotide triphosphate* (d-NTP) baru. Sekuen oligonukleotida pendek ini disebut dengan primer (oligonukleotida = lebih dari satu molekul nukleotida yang saling terhubung melalui ikatan fosfodiester).

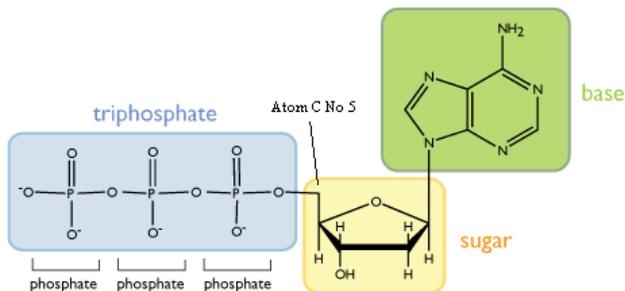
Dalam setiap teknik PCR umumnya ada sepasang primer oligonukleotida yang susunan basanya komplemen dengan DNA cetakan. Hal ini diperlukan agar masing-masing primer dapat menempel dengan kuat pada sekuen DNA target. Ilustrasi menempelnya primer pada sekeun DNA cetakan diperlihatkan dalam gambar 4.1.



Gambar 4.1. Ilustrasi penempelan primer oligonukleotida (P) pada DNA cetakan.

### 3. Molekul *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs)

Di dalam teknik PCR, molekul dNTPs yang terdiri atas dATP, dTTP, dGTP, dan dCTP (Gambar 4.2) dengan komposisi yang seimbang (komposisi yang direkomendasikan untuk setiap dNTP untuk reaksi yang dikatalisis enzim Taq DNA polymerase adalah 200-250  $\mu\text{M}$ ) (Sambrook & Russel, 2001) digunakan sebagai bahan untuk menyusun sekuen DNA yang baru. Enzim DNA polymerase berperan mengkatalisis terbentuknya reaksi penyambungan ikatan fosfodiester antara molekul dNTPs dan sekuen primer oligonukleotida.



Gambar 4.2. Struktur *deoxy ribose triphosphates* (dNTPs). Kandungan basa nitrogennya dapat A (dATP), T (dTTP), G (dGTP) atau C (dCTP).

#### **4. Kation divalen dan monovalen**

Kation divalent ( $Mg^{2+}$ ) dibutuhkan untuk aktivitas enzim DNA polymerase thermostable dalam mengkatalisis reaksi sintesis sekuen DNA baru. Namun karena  $Mg^{2+}$  juga diikat oleh dNTPs dan primer oligonuklotida yang digunakan dalam teknik PCR, maka konsentrasi molar  $Mg^{2+}$  yang digunakan harus melebihi konsentrasi molar dari gugus fosfat yang disumbang oleh dNTPs dan primer oligonucleotida.

Secara rutin konsentrasi molar  $Mg^{2+}$  yang digunakan adalah 1,5 mM, meskipun peningkatan konsentrasi  $Mg^{2+}$  sampai 4,5 mM atau 6 mM telah dilaporkan mampu menurunkan penempelan non spesifik dari primer di berbagai kasus. Sementara kation monovalen biasanya terkandung dalam buffer PCR standard dengan konsentrasi 50 mM KCl dan bekerja dengan baik untuk amplifikasi DNA dengan ukuran panjang >500 bp. Peningkatan konsentrasi KCl sampai 70-100 mM seringkali meningkatkan hasil dari DNA yang berukuran pendek (Sambrook dan Russel, 2001).

#### **5. Larutan Buffer**

Pada teknik PCR, yang di dalamnya melibatkan kerja enzim diperlukan kondisi keasamaan larutan yang terjaga baik. Inilah peran dari larutan buffer, yaitu untuk memelihara (menyangga) pH larutan agar tetap stabil sehingga kinerja enzim DNA polymerase tidak terganggu. Umumnya larutan buffer yang digunakan adalah Tris-Cl dengan pH yang diatur antara 8,3-8,8 pada suhu ruang.

#### **6. DNA Cetakan (template)**

DNA cetakan (template) merupakan DNA yang dijadikan target perbanyakannya. Di dalam DNA cetakan ada sekuen yang dijadikan target secara khusus untuk dilakukan perbanyakannya dengan bantuan enzim DNA polymerase thermostable.

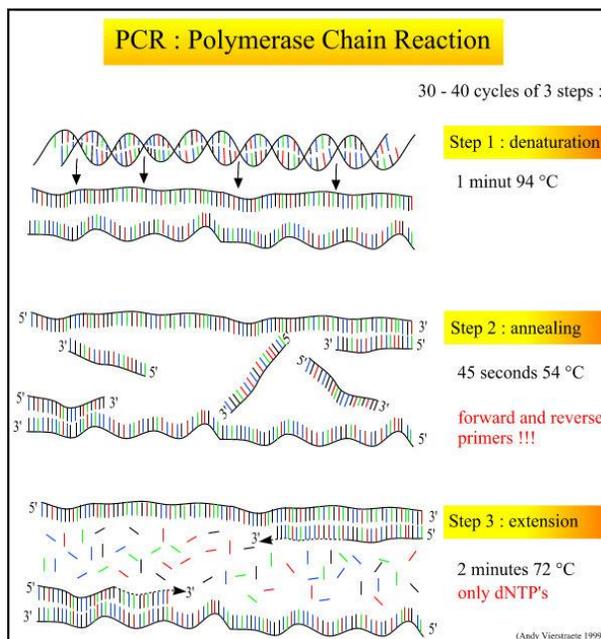
DNA cetakan yang digunakan dapat dalam bentuk linier (lurus) ataupun sirkular (bulat). Namun secara umum, amplifikasi sekuen target pada DNA yang berbentuk linier relatif lebih mudah dan lebih efisien daripada sekuen target yang terletak pada DNA yang berbentuk sirkular. Sementara DNA cetakan yang memiliki bobot molekul besar (>10 kb) lebih sulit diamplifikasi daripada DNA cetakan yang berukuran kecil (Sambrook & Russel, 2001).

### **B. Siklus dalam PCR**

Untuk mengamplifikasi sekuen DNA cetakan menggunakan teknik PCR, sejumlah siklus diperlukan agar diperoleh produk PCR dalam jumlah yang memadai. Idealnya banyaknya siklus PCR berkisar 30-40

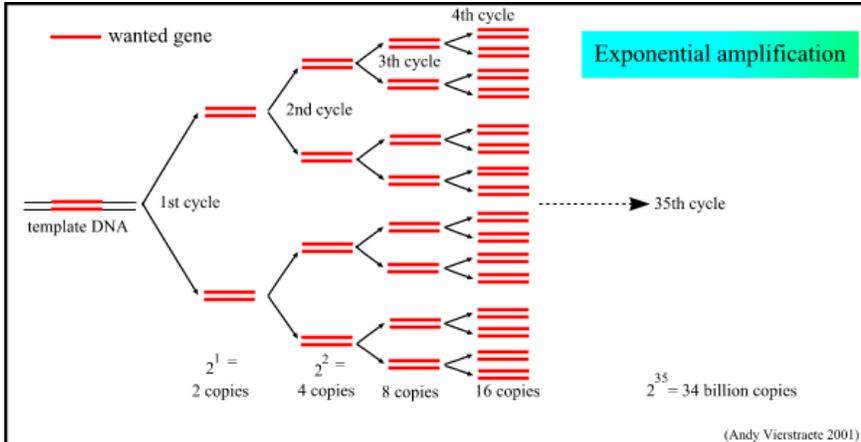
siklus. Jumlah siklus yang terlalu sedikit membuat produk PCR diperoleh dalam jumlah yang minimum, sementara jumlah siklus yang terlalu banyak menurunkan kinerja enzim DNA polymerase sehingga dapat meningkatkan peluang terjadinya kesalahan.

Setiap siklus terdiri atas tiga tahap berkelanjutan, yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan primer), dan ekstensi (polimerisasi atau pemanjangan). Pada tahap denaturasi, DNA cetakan didenaturasi dengan mengatur suhu  $\sim 95^{\circ}\text{C}$ . Pada tahap *annealing*, suhu diturunkan sampai mencapai  $\sim 55^{\circ}\text{C}$  atau sesuai *melting temperature* ( $T_m$ ) dari oligonukleotida primer (Glick & Jack. 1994). Pada tahap ini, basa primer berpasangan dengan sekuen komplementernya di dalam DNA cetakan. Primer oligonukleotida melekat pada masing-masing utas tunggal DNA cetakan dengan arah yang berlawanan (primer *satu* melekat pada ujung utas DNA ( $5' \rightarrow 3'$ ) sedangkan primer yang lain melekat pada ujung utas DNA komplementernya ( $3' \rightarrow 5'$ ). Pada tahap selanjutnya, suhu dinaikkan menjadi  $\sim 72^{\circ}\text{C}$ . Pada tahap ini (tahap ekstensi DNA), enzim *Taq DNA Polimerase* mengkatalisis reaksi penambahan mononukleotida (dNTPs) pada primer, sesuai dengan utas DNA komplemen yang berada di sebelahnya. Suhu pada setiap tahap diatur sedemikian rupa sehingga dihasilkan amplifikasi sekuen DNA cetakan yang efisien (Saiki *et al.* 1989). Tahap yang terjadi pada setiap siklus PCR, yaitu denaturasi, *annealing*, dan ekstensi disajikan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Tahap dalam setiap siklus PCR

Penghitungan jumlah utas baru DNA yang berhasil diperbanyak melalui teknik PCR dapat dihitung berdasarkan rumus  $2^n$  (n adalah banyaknya siklus). Diilustrasikan pada gambar 4.4 di bawah ini, jika jumlah siklus 35, maka produk PCR diperkirakan mengandung 34 milyar kopi DNA.



Gambar 4.4. Peningkatan eksponensial jumlah kopi DNA selama berlangsungnya PCR.

### C. Faktor-faktor Kritis Keberhasilan Teknik PCR

Tidak selamanya teknik PCR yang dilakukan menghasilkan produk PCR seperti yang diinginkan. Perlu dilakukan upaya optimasi dengan mempertimbangkan sejumlah faktor yang dapat menjadi penentu berhasil atau tidaknya teknik PCR yang kita lakukan. Beberapa faktor kritis yang ikut berperan adalah:

1. Peralatan
2. Jumlah siklus PCR
3. Konsentrasi enzim
4. Konsentrasi  $MgCl_2$
5. Konsentrasi dNTPs
6. Sekuen Primer
7. DNA cetakan (*template*)

**Penjelasan dari masing-masing faktor adalah sebagai berikut.**

#### 1. Peralatan

Peralatan yang dimaksud mencakup thermocycler dan alat pendukung seperti tabung reaksi PCR yang digunakan. Peralatan thermocycler harus secara rutin dicek untuk mengukur keakuratan suhunya, termasuk juga untuk mengetahui kinerjanya jika dilakukan

analisis ulangan. Sementara tipe tabung reaksi yang digunakan harus benar-benar diperhatikan agar ukurannya sesuai dengan sumur-sumur (lubang) dalam alat thermocycler. Selain itu faktor ketebalan tabung juga harus diperhatikan karena dapat mempengaruhi pentransferan panas dari alat thermocycler ke larutan PCR.

2. Jumlah Siklus

Jumlah siklus PCR turut mempengaruhi jumlah dan kualitas produk PCR. Semakin sedikit jumlah siklus akan semakin sedikit pula jumlah produk PCR yang dihasilkan. Namun peningkatan jumlah siklus pada batas tertentu tidak berbanding lurus dengan peningkatan jumlah produk PCR. Jumlah siklus terlalu banyak akan mempengaruhi keefektifan kerja enzim DNA polymerase (kinerjanya akan semakin menurun) yang berdampak pada semakin tingginya tingkat kesalahan yang mungkin dihasilkan.

3. Konsentrasi Enzim

Enzim DNA polymerase berperan dalam mengkatalisis reaksi pembentukan ikatan fosfodiester antar dNTP. Konsentrasi enzim yang terlalu rendah menyebabkan keefektifan kerjanya menjadi terganggu. Sementara konsentrasi enzim yang berlebih dinilai sebagai pemborosan. Untuk rutin PCR, konsentrasi Taq DNA polimerase 0,5-2,5 unit untuk setiap 25-50  $\mu$ l reaksi standard dianggap cukup baik. Enzim Taq DNA polymerase akan menurun kinerjanya jika akumulasi jumlah produk amplifikasi telah mencapai  $1,4 \times 10^{12}$  sampai  $7 \times 10^{12}$  molekul (Sambrook & Russel, 2001).

4. Konsentrasi  $MgCl_2$

Seperti yang sudah diinformasikan sebelumnya, konsentrasi  $MgCl_2$  (berkontribusi terhadap jumlah kation  $Mg^{2+}$ ) turut mempengaruhi hasil PCR. Kation divalent ini dibutuhkan untuk aktivitas enzim. Jumlah yang tidak memadai akan menyebabkan kinerja enzim DNA polymerase menjadi terganggu yang pada akhirnya akan mempengaruhi jumlah produk PCR yang dihasilkan.

5. Konsentrasi dNTPs

Molekul dNTPs diperlukan untuk sintesis utas DNA baru. Jumlahnya yang tidak memadai akan menyebabkan pembentukan utas DNA baru menjadi terganggu. Selain jumlah yang harus mencukupi, komposisi masing-masing molekul dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dan dCTP) juga harus seimbang agar tidak terjadi kesalahan dalam penyusunan sekuen DNA baru.

6. Sekuen Primer

Primer oligonukleotida diperlukan untuk mengawali pembentukan sekuen DNA baru dalam teknik PCR. Agar proses PCR berjalan optimum, sekuen primer harus didesain sedemikian rupa sehingga susunan basanya komplemen dan menempel baik dengan

sekuen DNA cetakan (tidak mengandung banyak basa A dan T, ujung 3' primer didesain mengandung basa G atau C, ukuran primer tidak terlalu pendek atau panjang, dihindari susunan basa yang memungkinkan terjadinya *self priming*, dan lain sebagainya).

#### 7. DNA Cetakan

DNA cetakan mengandung gen yang menjadi target amplifikasi (diperbanyak). Konsentrasi DNA cetakan harus dioptimasi. Konsentrasi DNA cetakan yang terlalu rendah akan menyulitkan primer oligonukleotida menemukan target yang akan diperbanyak, sementara konsentrasi yang terlalu tinggi akan cenderung meningkatkan kemungkinan terjadinya kesalahan penempelan primer pada sekuen DNA yang dijadikan target. Selain dalam hal konsentrasi, kemurnian DNA cetakan yang digunakan juga harus diperhatikan. Semakin murni DNA cetakan yang digunakan akan semakin baik. DNA cetakan dengan tingkat kemurnian rendah akan mempengaruhi hasil reaksi karena kontaminan yang masih terkandung dimungkinkan dapat mengganggu terjadinya proses amplifikasi.

### D. Prosedur PCR

Prosedur PCR yang dicontohkan di bawah ini adalah PCR untuk amplifikasi sekuen marka mikrosatelit (*Simple Sequence Repeat = SSR*).

1. Konsentrasi semua sampel DNA dibuat sama.
2. PCR Mix dibuat dengan ketentuan sebagai berikut:
  - a) DNA template 5  $\mu$ l ( $\approx$  50-100 ng)
  - b) Primers (R+F) 2 $\mu$ l
  - c) Go Taq green 12,5 $\mu$ l
  - d) H<sub>2</sub>O 5,5  $\mu$ l
  - Total volume 25
3. Proses PCR dijalankan dengan ketentuan sebagai berikut.

Tahap	Waktu (menit)	Temperatur ( $^{\circ}$ C)
a) Denaturasi I	5	75
b) Denaturasi II	3	95
c) Annealing	1	(tergantung T <sub>m</sub> primer)
d) Extension	2	72
e) Final extension	10	72
f) Storing forever		5
4. Sampel siap dilanjutkan dengan proses elektroforesis.

## E. Soal Latihan

1. Jelaskan dengan singkat apakah itu teknik PCR.
2. Komponen apa saja yang harus ada untuk amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR?
3. Jelaskan apa yang saudara ketahui tentang enzim DNA polymerase *Thermus aquaticus*. Mengapa enzim ini menjadi sangat fenomenal dalam teknik bioteknologi?
4. Jelaskan apa yang dimaksud dengan siklus PCR.
5. Hal-hal apa yang harus diperhatikan agar amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR dapat berhasil?

## DAFTAR PUSTAKA

- Glick, B.R. and J.P. Jack. 1994. *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. Washington DC: ASM Press.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Ed ke-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saiki, R.K.. 1989. *The design and optimization of the PCR*. Di dalam: Henry AE, editor. *PCR Technology Principles & applications for DNA Amplifications*. New York : M Stockton.
- Saiki, R.K., H.G. David, S. Susanne, J.S. Stephen, H. Russel, T.H. Glenn, B.M. Kary and A.E. Henry. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491.