

PRINSIP UMUM DAN PELAKSANAAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]

Darmo Handoyo dan Ari Rudiretna

Pusat Studi Bioteknologi – Universitas Surabaya

Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) is an in vitro technique for the amplification of a specific DNA region without prior transfer into living cells. It is a powerful technique because a million-fold amplification can be achieved only in a few hours. For the carrying out of PCR, pair of primers are needed that flank the DNA region to be amplified. A primer is an oligonucleotide with a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence in the DNA template. This paper will discuss the general principles of PCR, the detailed procedure for carrying out the PCR and the various factors affecting the optimal PCR results. This technique was introduced by Kary Mullis in 1985, for which he obtained the Nobel Prize in 1993.

Keywords: PCR; DNA amplification; primers

PENDAHULUAN

Polymerase Chain Reacton (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan diketemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah

merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekular.

PRINSIP-PRINSIP UMUM PCR

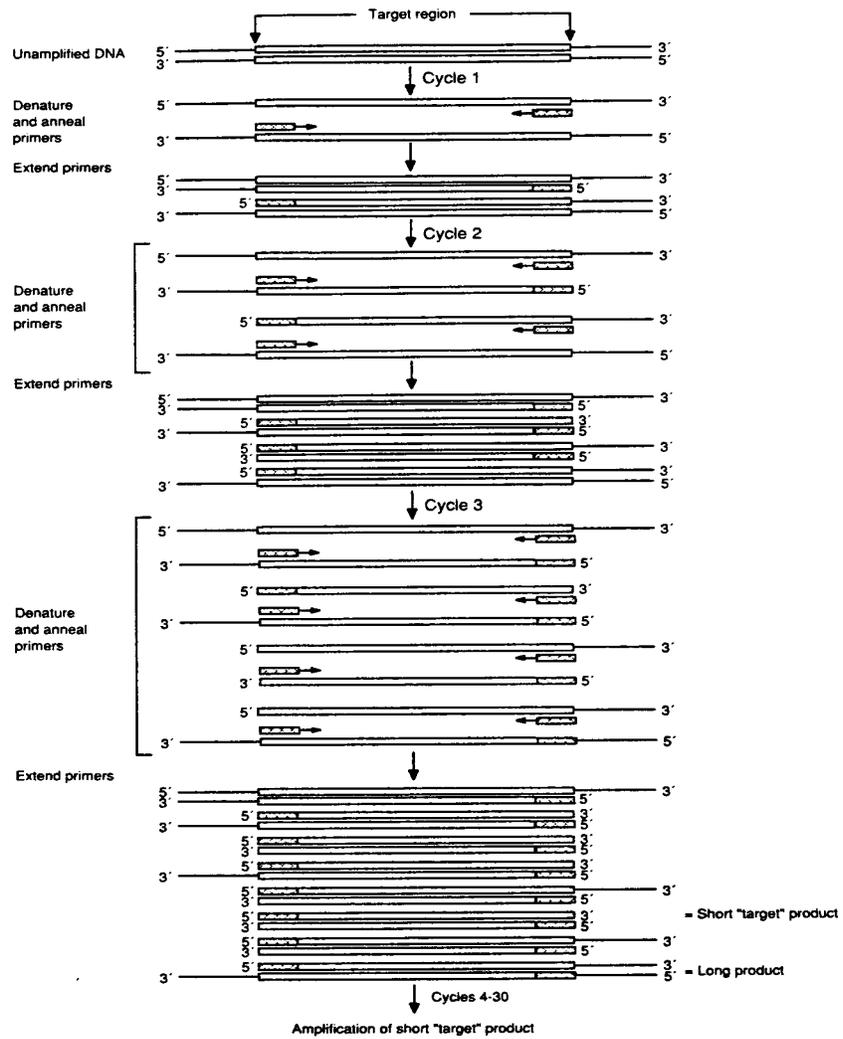
Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA.

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*post-extension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Tahapan proses PCR dapat dilihat pada gambar 1.

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton and Graham, 1994).

Jumlah kopi fragmen DNA target (amplicon) yang dihasilkan pada akhir siklus PCR dapat dihitung secara teoritis menurut rumus:

Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)



Gambar 1. Bagan Proses *Polymerase Chain Reaction*

$$Y = (2^n - 2n)X$$

Y : jumlah amplicon

n : jumlah siklus

X : jumlah molekul DNA templat semula

Jika $X = 1$ dan jumlah siklus yang digunakan adalah 30, maka jumlah amplicon yang diperoleh pada akhir proses PCR adalah 1.074×10^9 . Dari fenomena ini dapat terlihat bahwa dengan menggunakan teknik PCR dimungkinkan untuk mendapatkan fragmen DNA yang diinginkan (amplicon) secara eksponensial dalam waktu relatif singkat.

Umumnya jumlah siklus yang digunakan pada proses PCR adalah 30 siklus. Penggunaan jumlah siklus lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan jumlah amplicon secara bermakna dan memungkinkan peningkatan jumlah produk yang non-target.

Perlu diingat bahwa di dalam proses PCR efisiensi amplifikasi tidak terjadi 100 %, hal ini disebabkan oleh target templat terlampaui banyak, jumlah polimerase DNA terbatas dan kemungkinan terjadinya *reannealing* untai target.

PELAKSANAAN PCR

Untuk melakukan proses PCR diperlukan komponen-komponen seperti yang telah disebutkan di atas. Pada bagian ini akan dijelaskan secara rinci kegunaan dari masing-masing komponen tersebut.

1. Templat DNA

Fungsi DNA templat di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa

Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju.

Penyiapan DNA templat untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA templat tergantung dari tujuan eksperimen.

Pembuatan DNA templat dengan menggunakan metode lisis dapat digunakan secara umum, dan metode ini merupakan cara yang cepat dan sederhana untuk pendedahan DNA kromosom ataupun DNA plasmid. Prinsip metode lisis adalah perusakan dinding sel tanpa harus merusak DNA yang diinginkan. Oleh karena itu perusakan dinding sel umumnya dilakukan dengan cara memecahkan dinding sel menggunakan buffer lisis. Komposisi buffer lisis yang digunakan tergantung dari jenis sampel. Beberapa contoh buffer lisis yang biasa digunakan mempunyai komposisi sebagai berikut: 5 mM Tris-Cl pH8,5; 0,1 mM EDTA pH 8,5; 0,5 % Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Buffer lisis ini umumnya digunakan untuk jenis sampel yang berasal dari biakan, sel-sel epitel dan sel akar rambut. Contoh lain dari buffer lisis adalah buffer lisis K yang mempunyai komposisi sebagai berikut: buffer PCR (50mM KCl, 10-20mM Tris-Cl dan 2,5mM MgCl₂); 0,5 % Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Buffer lisis K ini biasanya digunakan untuk melisis sampel yang berasal dari sel darah dan virus.

Selain dengan cara lisis, penyiapan DNA templat dapat dilakukan dengan cara mengisolasi DNA kromosom ataupun DNA plasmid menurut metode standar yang tergantung dari jenis sampel asal DNA tersebut diisolasi. Metode isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid memerlukan tahapan yang lebih kompleks dibandingkan dengan penyiapan DNA dengan menggunakan metode lisis. Prinsip isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid adalah pemecahan dinding sel, yang diikuti dengan pemisahan DNA kromosom / DNA plasmid

dari komponen-komponen lain. Dengan demikian akan diperoleh kualitas DNA yang lebih baik dan murni.

2. Primer

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA.

Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat.

Dalam melakukan perancangan primer harus dipenuhi kriteria-kriteria sebagai berikut:

a. Panjang primer

Di dalam merancang primer perlu diperhatikan panjang primer yang akan dipilih. Umumnya panjang primer berkisar antara 18 – 30 basa. Primer dengan panjang kurang dari 18 basa akan menjadikan spesifisitas primer rendah. Untuk ukuran primer yang pendek kemungkinan terjadinya *mispriming* (penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan) tinggi, ini akan menyebabkan berkurangnya spesifisitas dari primer tersebut yang nantinya akan berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan untuk panjang primer lebih dari 30 basa tidak akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna dan ini akan menyebabkan lebih mahal.

b. Komposisi primer.

Dalam merancang suatu primer perlu diperhatikan komposisinya. Rentetan nukleotida yang sama perlu dihindari, hal ini dapat menurunkan spesifisitas primer yang dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* di tempat lain. Kandungan (G+C) (% jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan (G+C) DNA target. Sebab primer dengan % (G+C) rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju dengan demikian akan menurunkan efisiensi proses PCR. Selain itu, urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* dari pada G atau C, dengan demikian akan dapat menurunkan spesifisitas primer.

c. Melting temperature (T_m)

Melting temperatur (T_m) adalah temperatur di mana 50 % untai ganda DNA terpisah. Pemilihan T_m suatu primer sangat penting karena T_m primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR. T_m berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. Secara teoritis T_m primer dapat dihitung dengan menggunakan rumus $[2(A+T) + 4(C+G)]$. Sebaiknya T_m primer berkisar antara 50 – 65 °C.

d. Interaksi primer-primer

Interaksi primer-primer seperti *self-homology* dan *cross-homology* harus dihindari. Demikian juga dengan terjadinya *mispriming* pada daerah lain yang tidak dikehendaki, ini semua dapat menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah dan di samping itu konsentrasi primer yang digunakan menjadi berkurang selama proses karena terjadinya *mispriming*. Keadaan ini akan berpengaruh pada efisiensi proses PCR.

3. dNTPs (deoxynucleotide triphosphates)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA templat. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan.

4. Buffer PCR dan $MgCl_2$

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer di sini adalah untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg^{2+} , ion tersebut berasal dari $MgCl_2$. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Dengan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Dalam proses PCR konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh pada spesifisitas dan perolehan proses. Umumnya buffer PCR sudah mengandung senyawa $MgCl_2$ yang diperlukan. Tetapi disarankan sebaiknya antara $MgCl_2$ dan buffer PCR dipisahkan supaya dapat dengan mudah dilakukan variasi konsentrasi $MgCl_2$ sesuai yang diperlukan.

5. Enzim Polimerase DNA

Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim polimerase DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil

sampai temperatur 95 °C. Aktivitas polimerase DNA bergantung dari jenisnya dan dari mana bakteri tersebut diisolasi . Sebagai contoh adalah enzim *Pfu* polimerase (diisolasi dari bakteri *Pyrococcus furiosus*) mempunyai aktivitas spesifik 10x lebih kuat dibandingkan aktivitas spesifik enzim *Taq* polimerase (diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*). Penggunaan jenis polimerase DNA berkaitan erat dengan buffer PCR yang dipakai.

Dengan menggunakan teknik PCR, panjang fragmen DNA yang dapat diamplifikasi mencapai 35 kilo basa. Amplifikasi fragmen DNA pendek (kurang dari tiga kilo basa) relatif lebih mudah dilakukan. Untuk mengamplifikasi fragmen DNA panjang (lebih besar dari tiga kilo basa) memerlukan beberapa kondisi khusus, di antaranya adalah diperlukan polimerase DNA dengan aktivitas yang kuat dan juga buffer PCR dengan pH dan kapasitas tinggi (High-salt buffer).

OPTIMASI PCR

Untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal perlu dilakukan optimasi proses PCR. Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Optimasi kondisi berkaitan erat dengan faktor-faktor seperti jenis polimerase DNA; suhu; konsentrasi, dalam hal ini berkaitan dengan dNTPs, MgCl₂ dan DNA polimerase; buffer PCR dan waktu.

1. Jenis polimerase DNA

Kemampuan mengkatalisis reaksi polimerasi DNA pada proses PCR yang terjadi pada tahap ekstensi untuk DNA rantai panjang akan berbeda dengan untuk DNA rantai pendek. Penggunaan jenis DNA polimerase tergantung pada panjang DNA target yang akan diamplifikasi. Untuk panjang fragmen DNA lebih besar dari tiga kilobasa akan memerlukan jenis polimerase dengan aktivitas tinggi.

2. Konsentrasi dNTPs, MgCl₂; polimerase DNA

Konsentrasi optimal dNTPs ditentukan oleh panjang target DNA yang diamplifikasi. Untuk panjang target DNA kurang dari satu kilobasa biasanya digunakan konsentrasi dNTPs sebanyak 100 μ M, sedangkan untuk panjang target DNA lebih besar dari satu kilobasa diperlukan konsentrasi dNTPs sebanyak 200 μ M.

Umumnya konsentrasi optimal MgCl₂ berkisar antara 1,0 – 1,5 mM. Konsentrasi MgCl₂ yang terlalu rendah akan menurunkan perolehan PCR. Sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan akumulasi produk non target yang disebabkan oleh terjadinya *mispriming*.

Jumlah polimerase DNA yang digunakan tergantung pada panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Untuk panjang fragmen DNA kurang dari dua kilobasa diperlukan 1,25 – 2 unit per 50 μ L campuran reaksi, sedangkan untuk panjang fragmen DNA lebih besar dari dua kilobasa diperlukan 3 – unit per 50 μ L campuran reaksi.

3. Suhu

Pemilihan suhu pada proses PCR sangat penting karena suhu merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan suatu PCR. Dalam hal ini suhu berkaitan dengan proses denaturasi DNA templat, *annealing* dan ekstensi primer. Suhu denaturasi DNA templat berkisar antara 93 – 95°C, ini semua tergantung pada panjang DNA templat yang digunakan dan juga pada panjang fragmen DNA target. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas polimerase DNA yang akan berdampak pada efisiensi PCR. Selain itu juga dapat merusak DNA templat, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan proses denaturasi DNA templat tidak sempurna. Pada umumnya suhu denaturasi yang digunakan adalah 94°C.

Secara umum suhu *annealing* yang digunakan berkisar antara 37 - 60°C. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan T_m primer yang digunakan untuk

proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan ($T_m - 5$)°C sampai dengan ($T_m + 5$)°C. Dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan perlu diperhatikan adanya *mispriming* pada daerah target dan non-target, dan keberhasilan suatu proses PCR akan ditentukan oleh eksperimen.

Proses ekstensi primer pada proses PCR selalu dilakukan pada suhu 72°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimum polimerase DNA yang biasa digunakan untuk proses PCR.

4. Buffer PCR

Buffer PCR yang digunakan berkaitan dengan pH dan kapasitas buffer nya. Dalam perdagangan ada dua jenis buffer PCR yaitu “*Low-salt buffer*” (pH 8,75 dan kapasitas buffer rendah) dan “*High-salt buffer*” (pH 9,2 dan kapasitas buffer tinggi). Umumnya buffer PCR tersedia sesuai dengan jenis polimerase DNA nya. Penggunaan jenis buffer ini tergantung pada DNA target yang akan diamplifikasi. Untuk panjang DNA target antara 0 – 5 kilobasa biasanya diperlukan “*low-salt buffer*” sedangkan untuk panjang DNA target lebih besar dari lima kilobasa digunakan “*high-salt buffer*”.

5. Waktu

Pemilihan waktu yang digunakan berkaitan dengan proses denaturasi DNA templat, *annealing* dan ekstensi primer. Untuk denaturasi DNA templat umumnya dilakukan selama 30 – 90 detik, ini semua tergantung pada DNA templat yang digunakan. Waktu denaturasi yang terlalu lama akan merusak templat DNA dan sekaligus dapat menurunkan aktivitas polimerase DNA. Sedangkan waktu denaturasi yang terlalu pendek akan menyebabkan proses denaturasi tidak sempurna.

Penentuan waktu untuk proses *annealing* berkaitan dengan panjang primer. Untuk panjang primer 18 – 22 basa cukup dengan 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa diperlukan waktu *annealing* 60 detik.

Pemilihan waktu ekstensi primer tergantung pada panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Secara umum untuk mengamplifikasi setiap satu kilo basa DNA diperlukan waktu 30 – 60 detik.

Pada setiap melakukan PCR harus dilakukan juga kontrol positif, ini diperlukan untuk memudahkan pemecahan masalah apabila terjadi hal yang tidak diinginkan. Selain itu juga harus dilakukan terhadap kontrol negatif untuk menghindari kesalahan positif semu.

PENUTUP

Teknik PCR dapat didayagunakan (kadang dengan modifikasi) guna fasilitasi analisis gen. Selain itu telah dikembangkan banyak sekali aplikasi praktis. Sebagai contoh teknik dan aplikasi PCR dapat disebutkan sebagai berikut: kloning hasil PCR; sekuensing hasil PCR; kajian evolusi molekular; deteksi mutasi (penyakit genetik; determinasi seks pada sel prenatal; kajian forensik (tersangka kriminal, tersangka ayah pada kasus paternal); dan masih banyak lainnya. Dengan demikian, penemuan dan manfaat teknik PCR ini berdampak sangat luas terhadap kemajuan sains dan teknologi secara umum.

DAFTAR PUSTAKA

- Bruce, B. (Eds.). 1997. *Genome Analysis, a laboratory manual*. vol 1 (Analyzing DNA). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Innis, M.A.(Eds.). 1990. *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*. California: Academic Press, Inc..
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. *PCR*. UK: Bios Scientific Publisher.

Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Watson, J.D., M. Gilman, Witkowski, J., Zohler, M. 1992. *Recombinant DNA*. USA: Scientific American Books.