

Nama: Cindi Kholifah Millenia

NPM: 1814191005

Jurusan Proteksi Tanaman

Tugas Ilmu Penyakit Benih

1. Jenis-jenis teknik PCR yang digunakan dalam identifikasi penyakit.

Jawab:

Ada beberapa macam PCR, berdasarkan jenis dan kegunaannya, yaitu *Multiplex* PCR, RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), *Long Distance* PCR, AP-PCR Genom (*Arbitrarily Primed-PCR*), *Deteksi Target* RNA, RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR/Transkripsi balik*), QC-PCR (*Quantitative Comparative-PCR*), dan *Nested Amplification*.

- *Multiplex* PCR menggunakan beberapa pasang primer yang spesifik untuk target yang berbeda pada suatu amplifikasi DNA yang sama. Koamplifikasi ini mempunyai beberapa tujuan, yaitu dapat mendeteksi adanya kelainan pada sekwens DNA yang panjang, dapat menguji segmen dari target genom yang tidak terkait, sebagai kontrol internal, dan untuk uji multi patogen dari spesimen tunggal, dengan biaya lebih murah. Sebagai contoh dari *multiplex* PCR adalah deteksi gen yang spesifik terhadap toksin *Staphylococcus aureus* dan *Clostridium difficile* dan koamplifikasi kontrol internal secara kompetitif.
- *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR) merupakan jenis PCR yang mendeteksi mutasi yang terdapat pada genom DNA. Teknik ini mampu mengamplifikasi DNA termasuk urutan yang termutasi dengan menggunakan apitan primer dan diikuti enzim restriksi terhadap produk PCR.
- *Long Distance* PCR merupakan jenis PCR yang berguna untuk mengamplifikasi dan mendeteksi produk PCR dengan ukuran 50 kb atau lebih.

- AP-PCR Genom (*Arbitrarily Primed-PCR*) merupakan jenis PCR yang dapat digunakan untuk mendeteksi polimorfisme sehubungan dengan pemetaan gen, filogenetik dan populasi biologi.
- Deteksi Target RNA merupakan PCR yang digunakan untuk mendeteksi ekspresi gen yang berbeda dan dapat langsung diklon dengan mengisolasi produk amplifikasi. Template RNA dapat dideteksi dengan PCR jika ekstrak RNA terlebih dahulu diubah menjadi c-DNA dengan menggunakan enzim reverse transcriptase.
- RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*/transkripsi balik) berguna untuk mendeteksi dan mengamplifikasi RNA.
- QC-PCR (*Quantitative Comparative-PCR*), menggunakan tambahan eksogen internal. Tambahan tersebut terdiri dari fragmen DNA yang pada ke-2 sisinya terdapat urutan DNA target dan urutan primer spesifik.
- Nested amplification, salah satu modifikasi PCR yang populer adalah PCR yang menggunakan nested set sprimer dan dikenal sebagai nested amplification. Dalam suatu protokol nested amplification, pada putaran pertama amplifikasi digunakan sepasang primer dan amplifikasi dilakukan sebanyak 15-30 siklus. Produk dari amplifikasi putaran pertama ini dipindahkan ke tabung lain dan PCR ke dua dijalankan dengan menggunakan sepasang primer yang spesifik terhadap internal sequence dari produk PCR yang dihasilkan pada putaran pertama. PCR putaran ke dua ini juga dilakukan sebanyak 15-30 siklus, kemudian produk dari PCR putaran ke dua ini dideteksi dengan menggunakan elektroforesis gel. Keuntungan dari nested amplification ini, yaitu memberikan sensitivitas yang sangat tinggi.

(**Sumber:** Irene E. Riuwpassa, St. Rafiah, I Wayan S.A. 2008. Deteksi *Helicobacter Pylori* Pada Plak Gigi dengan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Dentofasial*. 7(1). 38-46.).

2. Prinsip kerja PCR

Jawab:

Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat:

1. Denaturasi

Di dalam proses PCR, 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.

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.

3. Pemanjangan Primer (Extention)

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.

(**Sumber:** Zuhriana K. Yusuf. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Jurnal Saintek*. 5(6).).