

Nama : Rahmi Aulia Azhar

NPM : 1814191029

Jurusan : Proteksi Tanaman

Tugas Praktikum Mata Kuliah Ilmu Penyakit Benih

Uraikan pertanyaan di bawah ini dengan jelas dan cantumkan referensinya!

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

Jawaban:

Santoso et al (2013), menyatakan bahwa kemajuan di bidang biologi molekuler telah menghadirkan beberapa teknik yang dapat digunakan untuk deteksi dan identifikasi virus, salah satunya adalah *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Teknik PCR sangat sensitive dan spesifik untuk deteksi dan identifikasi penyakit dan identifikasi patogen–patogen tanaman. Rojas et al (1993) dalam Santoso et al (2013) menyatakan bahwa teknik PCR dalam identifikasi penyakit tumbuhan juga dapat digunakan untuk mengetahui mengenai komposisi populasi patogen dan diversitas genetik virus.

Yusuf (2010), menyatakan bahwa teknik PCR dapat dibagi menjadi beberapa jenis yaitu:

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 didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasida 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 diantara 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 jenis 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)* yang 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.
7. *Multiplex PCR* menggunakan beberapa pasang primer yang spesifik untuk target yang berbeda pada suatu amplifikasi DNA yang sama. Digunakan untuk mengamplifikasi banyak target fragmen DNA dalam satu kali reaksi PCR, yang memiliki kunci pada penggunaan primer dalam jumlah banyak yang telah dioptimasi berdasarkan suhu terbaik dari masing-masing primer.
8. *PCR-ELISA* digunakan untuk menangkap asam nukleat yang meniru prinsip Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) yang terkait.

Sumber :

- Santoso, T J., Hidayat, S H., Herman, M., dan Sudarsono. 2013. Aplikasi Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Menggunakan Primer *Degenerate* dan Spesifik Gen AV1 Untuk Mendeteksi *Begomovirus* Pada Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J.Hort Indonesia*. 4(3):140-149.
- Yusuf, Z K. 2010. *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR). *Saintek*. Vol 5, No 6.

2. Prinsip Kerja PCR?

Jawaban:

Prinsip umum PCR adalah sederhana tetapi elegan. Primer oligonukleotida mula-mula didesain agar berkomplemen dengan ujung-ujung dari sekuens yang akan diamplifikasi. Kemudian, primer tersebut dengan jumlah yang berlebih dicampur dengan DNA template dan deoksiribonukleotida (dNTP) dalam buffer yang sesuai. Setelah pemanasan untuk denaturasi untai awal dan pendinginan untuk memungkinkan primer annealing, selanjutnya oligonukleotida tersebut masing-masing akan berikatan dengan untai yang berbeda dari dua untai fragmen DNA target. Primer-primer tersebut akan annealing pada posisi yang memungkinkan produk amplifikasi dari masing-masing untai DNA akan overlap dengan dibatasi oleh sisi tempat annealing dari primer yang berlawanan. Dikarenakan proses denaturasi, annealing, dan ekstensi oleh enzim DNA polymerase terus berlangsung, maka primer-primer tersebut secara berulang akan berikatan dengan template DNA awal dan juga sisi komplementer dari untai-untai yang baru dibentuk, dan kemudian memanjang untuk menghasilkan salinan DNA yang baru (Kusnadi dan Arumingtyas, 2020).

Budiarto (2015) menyatakan bahwa, prinsip-prinsip kerja mendasar PCR yaitu pertama siklus denaturasi yang dimana dua untas DNA dipisahkan secara fisik menggunakan suhu tinggi, lalu siklus annealing dimana suhu diturunkan untuk memfasilitasi penempelan DNA polymerase secara spesifik pada untas tunggal DNA yang sudah berkomplementasi dengan primer spesifiknya, kemudian siklus ketiga polymerase dimana untas tunggal DNA dibaca oleh DNA polymerase dengan menambahkan basa-basa DNA komplementernya maka fragmen DNA dapat diperbanyak secara eksponensial.

Handoyo dan Rudiretna (2001) mengatakan bahwa proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA template; (2) Denaturasi DNA template; (3) Penempelan primer pada template (annealing); (4) Pemanjangan primer (extension); dan (5) Pemantapan (post-extension), untuk tahap (2) sampai dengan tahap (4) merupakan tahapan berulang (siklus).

Hasibuan (2015) menyatakan bahwa, proses PCR terdiri dari tiga tahapan, yaitu denaturasi DNA templat, penempelan (annealing) primer, dan polimerisasi (extension) rantai DNA.

1. Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusannya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90°C – 95°C .

2. Penempelan Primer (*Annealing*)

Pada tahap penempelan primer (annealing), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50°C – 60°C . Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya misalnya pada 72°C .

3. Reaksi Polimerisasi (Extension)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72°C . Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'-nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polymerase. Jika siklus dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan di amplifikasi secara eksponensial (disebut ampikon yang berupa untai ganda), sehingga mencapai jumlah copy yang dapat dirumuskan dengan $(2^n)x$. Dimana n adalah jumlah siklus dan x adalah jumlah awal molekul DNA.

Selain ketiga proses tersebut, secara umum PCR didahului dan diakhiri oleh tahapan berikut: a). Pradenaturasi dilakukan selama 1-9 menit di awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA Polymerase (jenis hot-start alias baru aktif kalau dipanaskan terlebih dahulu). b). Final Elongasi biasanya dilakukan pada suhu optimum enzim (70-72°C) selama 5-15 menit untuk memastikan bahwa setiap utas tunggal yang tersisa sudah diperpanjang secara sempurna. Proses ini dilakukan setelah siklus PCR terakhir.

Sumber:

- Budiarto, B R. 2015. Polymerase Chain Reaction (PCR): Perkembangan Dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan. *BioTrends*. Vol. 6, No. 2.
- Handoyo, D., dan Rudieretna, A. 2001. Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. Vol.9, No. 1.
- Hasibuan, E. 2015. Peranan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) Terhadap Perkembangan Ilmu Pengetahuan. *Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara*.
- Kusnadi, J. dan Arumingtyas, E L. 2020. *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR): Teknik Dan Fungsi*. UB Press. Malang.