

Nama : Dani Tri Ananto

NPM : 1814191012

Proteksi Tanaman

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

Jawab :

a. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Digunakan dalam membedakan organisme berdasarkan analisis model derifat dari perbedaan DNA

b. *Inverse-PCR*

Metode ini digunakan ketika hanya terdapat satu sekuen internal yang diketahui. Metode ini digunakan khusus untuk mengidentifikasi sekuen antara dari beragam gen. template didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligase dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang terdapat jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah bergabung.

c. *Nested-PCR*

Proses ini untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan dalam mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut primer inner disimpan di antara 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

d. *Quantitative-PCR*

Metode ini digunakan dalam pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas, dimulai dari jurnal DNA, cDNA, atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel

e. *Reverse Transcriptase (RT-PCR)*

Metode ini digunakan dalam 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

f. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Bertujuan dalam mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini digunakan dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer – primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom

Sumber : Yusuf, Zuhriana K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Sainstek. 5 (6) : 1-6.

2. Prinsip kerja PCR

Dua pasang fragmen oligonukleotida (primer) yang saling berlawanan dan berkomplemen terhadap masing-masing utas DNAny dengan mengulang siklus (1) denaturasi dimana dua untas DNA dipisahkan secara fisik menggunakan suhu tinggi, (2) annealing dimana suhu diturunkan untuk memfasilitasi penempelan DNA polymerase secara spesifik pada untas tunggal DNA yang sudah berkomplementasi dengan primer spesifiknya, dan (3) polimerasi dimana utas tunggal DNA dibaca oleh DNA polymerase dengan menambahkan basa-basa DNA komplemennya.

Secara teknis perbanyak DNA dengan PCR memerlukan tujuh komponen yaitu (1) template/cetakan DNA yang akan diperbanyak, (2) enzim DNA polimerase tahan panas, (3) satu pasang primer, (4) dNTP, (5) kofaktor MgCl₂, (6) larutan penyangga dan (7) air. Ketujuh komponen tadi dicampurkan di dalam tubung ukuran 200 µL dalam kondisi dingin sebelum dilakukan PCR di dalam mesin thermal cycler.

Metode konvensional memperbanyak DNA dengan PCR terdiri dari tiga langkah/step yang diulang untuk suatu siklus tertentu yaitu (1) denaturasi cetakan/template DNA pada suhu 94-95° C, (2) annealing/penempelan primer-primer pada segmen tertentu DNA menggunakan suhu spesifik (suhu spesifik ini didapatkan dari nilai - T_m primer dikurangi 5° C) dimana fragmen DNA akan diperbanyak, dan (3) polimerasi pada suhu 72° C yaitu suhu optimal enzim untuk memanjangkan primer-primer yang sudah menempel tadi. Adapun waktu yang dibutuhkan untuk berpindah dari satu langkah ke langkah selanjutnya dalam satu kali siklus.

Sumber : Budiarto, Bugi Ratno. 2015. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* : Perkembangan dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan. *BioTrends*. 6 (2) :1-10.