

Nama : Galich Kusumaning Thias  
NPM : 1814191026  
Jurusan : proteksi Tanaman

### **Tugas**

Uraikan pertanyaan di bawah ini dengan jelas (cantumkan referensinya)

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

Jawab :

Jenis teknik PCR yang digunakan dalam identifikasi penyakit yaitu PCR konvensional, dan juga Real Time PCR. Real Time PCR lebih baik dan lebih efisien didalam kecepatan mendeteksi dibandingkan dengan menggunakan PCR Konvensional. Real Time PCR adalah teknik yang digunakan untuk memonitor progress reaksi PCR pada waktu yang sama. RT-PCR juga dikenal sebagai quantitative PCR (qPCR). Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif (Kurniawati dkk, 2019).

Modifikasi dari teknik PCR adalah sebagai berikut:

1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)  
Merupakan metode yang digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derifat dari perbedaan DNA.
2. Inverse-PCR,  
Merupakan metode yang 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 ligasi 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  
Metode ini dilakukan karena pada prosesnya 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 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.

#### 4. Quantitative-PCR

Metode ini digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode 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 sekuens 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 )

Metode ini digunakan untuk tujuan mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini dikembangkan oleh Welsh and Mc Clelland (1990) dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer – primer dengan sekuens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom (Yusuf, 2010).

## 2. Prinsip kerja PCR

Jawab :

### 1. Denaturasi

DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal, karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya 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  $90^{\circ}\text{C}$  –  $95^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Penempelan Primer (annealing)

Pada tahap ini primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  –  $60^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya, DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya misalnya pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$ .

## 3. Reaksi Polimerisasi (Extension)

Reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai terjadi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$ . Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polimerase. Jika siklus dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan di amplifikasi secara eksponensial (disebut amplikon yang berupa untai ganda), sehingga mencapai jumlah copy yang dapat dirumuskan dengan  $(2^n) \times x$ . Dimana  $n$  adalah jumlah siklus dan  $x$  adalah jumlah awal molekul DNA. Jadi, seandainya ada 1 copy DNA sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial (Hasibuan, 2015).

## DAFTAR PUSTAKA

- Hasibuan, E. 2015. *Peranan Teknik Polymerase Chain Reaction (Pcr) Terhadap Perkembangan Ilmu Pengetahuan*. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Sumatera Utara.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, dan Hayati, N. 2019. Aplikasi Polymerase Chain Reaction (Pcr) Konvensional Dan Real Time- Pcr Untuk Deteksi Virus Vnn (*Viral Nervous Necrosis*) Pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal TECHNO-FISH*. Vol (3)(1). Hal 19-30.
- Yusuf, Z. K. 2010. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). *Saintek* .Vol (5)(6).