

Nama : Ni Putu Ayu Kharisma

NPM : 1714191017

Tugas

1. Uraikan pertanyaan di bawah ini dengan jelas (cantumkan referensinya)
2. Jenis-jenis teknik PCR yang digunakan dalam identifikasi penyakit
Prinsip kerja PCR

Jawaban :

1. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Teknik dasar yang digunakan dalam Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR) adalah modifikasi dari PCR konvensional. Molekul RNA sebagai template dikonversi menjadi DNA komplementer (cDNA) sebelum diperbanyak (amplifikasi). Konversi RNA menjadi cDNA digenerasi menggunakan enzim reverse transcriptase, sehingga dapat menjadi template reaksi. Tipe ini biasa digunakan dalam metode penelitian penyisipan gen, diagnosa penyakit yang berhubungan dengan virus RNA dan kanker.

Real-Time PCR

Real-Time PCR merupakan suatu metode analisa yang dikembangkan dari reaksi PCR. Real time ini juga dikenal sebagai quantitative real time polymerase chain reaction atau q-PCR. Teknik ini dapat digunakan untuk mengamplifikasi sekaligus menghitung jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi tersebut. Prinsip utama Real-Time PCR yaitu menggunakan biomarker berupa pewarna fluorescent untuk memberi pelabelan pada oligonukleotida yang akan ditambahkan pada reaksi.

Nested PCR

Nested PCR adalah suatu teknik perbanyakan (replikasi) sampel DNA menggunakan bantuan enzim DNA polimerase yang menggunakan dua pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen. Dengan menggunakan Nested polymerase chain reaction, jika ada fragmen yang salah diamplifikasi, maka

kemungkinan bagian tersebut diamplifikasi untuk kedua kalinya oleh primer yang kedua. Dengan demikian, metode ini sangat spesifik dalam melakukan amplifikasi.

Multiplex-PCR

Jenis ini digunakan untuk mengamplifikasi banyak target fragmen DNA dalam satu kali reaksi PCR. Kuncinya adalah penggunaan primer dalam jumlah banyak yang telah dioptimasi berdasarkan suhu terbaik dari masing-masing primer.

Metode ini biasanya diaplikasikan dalam banyak studi genotiping, mutasi, dan analisis polimorfisme, analisis STR (Short Tandem Repeat) mikrosatelit, deteksi patogen dan GMO. Di laboratorium dapat digunakan sebagai dasar membedakan terhadap jenis-jenis bakteri penyebab penyakit yang sama.

(Sumber: <https://ibs.co.id/id/macam-macam-metode-pcr/>)

2. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu:

- (1) pra-denaturasi DNAtemplat
- (2) denaturasi DNA templat
- (3) penempelan primer pada templat(annealing)
- (4) pemanjangan primer (extension)
- (5) pemantapan (post-extension). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus),di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA.

Kunci dalam pelaksanaan reaksi PCR membutuhkan Taq Polymerase, Primer, DNA templat dan nukleotida (blok pembangun DNA). Keseluruhan bahan digabung dalam sebuah tube, bersama kofaktor yang dibutuhkan oleh enzim, dan melewati siklus pemanasan dan pendinginan berulang yang memungkinkan terjadinya amplifikasi DNA.

Sumber:

Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17–29.

Langkah kerja PCR melewati 3 tahap berikut:

Denaturation / denaturasi (96°C): Pada proses denaturasi, panas mempengaruhi strand DNA akan terpisah menjadi DNA beruntai tunggal (single-stranded).

Annealing / penempelan (55-65°C): Pada tahap penempelan ini, suhu annealing primer akan menempel dan berikatan pada daerah komplementer pada sekuen single-stranded DNA.

Extension / elongasi (72°C): Pada suhu ini Taq polymerase melakukan pemanjangan membentuk strand DNA baru.

(Sumber: <https://genecraftlabs.com/id/prinsip-kerja-pcr-serta-penjelasan/>)