

Nama: Dita Nur Fauziah

NPM: 1814191028

Proteksi Tanaman

Tugas Ilmu Penyakit Benih

1. Jenis-jenis Teknik PCR

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* (Irene, 2006).

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 (Irene, 2006).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 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 (Irene, 2006).

Long distance PCR merupakan jenis PCR yang berguna untuk mengamplifikasi dan mendeteksi produk PCR dengan ukuran 50 kb atau lebih (Irene, 2006).

AP-PCR Genom (*Arbitrarily Primed-PCR*) merupakan jenis PCR yang dapat digunakan untuk mendeteksi polimorfisme sehubungan dengan pemetaan gen, filogenetik dan populasi biologi (Irene, 2006).

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* (Irene, 2006).

RT-PCR (*reverse transcription-PCR*/transkripsi balik) 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 (Yusuf, 2010).

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 (Irene, 2006).

Salah satu modifikasi PCR yang populer adalah PCR yang menggunakan *nested sets* primer 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. Kadang tanpa hibridisasi dengan menggunakan *probe, single copy* dari target dapat terdeteksi.

Dengan mentransfer produk PCR putaran pertama ini, mengencerkan inhibitor yang mungkin ada pada sampel awal (Yuwono, 2006).

2. Prinsip Kerja PCR

1. Denaturasi

Pada suhu 94°C DNA mengalami denaturasi, artinya dari untai ganda akan dirubah atau membelah menjadi untai tunggal. Denaturasi ini merupakan proses yang penting jika proses ini tidak lengkap akan menyebabkan denaturasi secara cepat, sedangkan waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mempengaruhi enzim yang terdapat dalam master mix dan mempengaruhi keberhasilan PCR (Kurniawati, 2019).

2. Annealing

Ketika suhu mengalami penurunan 62°C merupakan proses penempelan (annealing) primer pada DNA yang telah terbelah secara spesifik. Penurunan suhu merupakan pelekatan primer pada DNA untai tunggal. Primer akan menempel pada pangkal (forward) dan ujung (reverse) masing-masing DNA tunggal (Kurniawati, 2019).

3. Pemanjangan (Extensioin)

Ketika suhu dinaikkan sampai 72°C, maka primer dengan bantuan DNA polymerase akan akan membentuk atau pemanjangan (extention) untai DNA sesuai dengan runutan DNA yang terbelah, sehingga akan membentuk dua buah DNA tunggal yang baru (Kurniawati, 2019).

DAFTAR PUSTAKA

Irene, E.R., Rafiah, S.T. Wayan, I.S.A. 2006. Deteksi helicobacter pylori pada plak gigi dengan Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Dentofasial*, Vol.7, No.1.

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 No.1.

Yuwono T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. Andi Pustaka. Yoyakarta.

Yusuf, Z.K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Saintek* Vol 5. No 6.