

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

9.2 PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik untuk memperbanyak urutan DNA tertentu secara *in vitro* dengan cara pemanjangan primer sebagai prekursor menggunakan DNA polymerase. Metoda PCR pertama kali diperkenalkan oleh Mullis dkk dari Cetus Corporation (Williams et al., 1988). Penggunaan PCR sangat terbatas sampai pada akhirnya DNA polymerase yang stabil pada suhu tinggi ditemukan.

Reaksi PCR memerlukan komponen-komponen sebagai berikut:

1. DNA target
2. Primer
3. Enzim DNA Polymerase
4. Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)
5. Bufer reaksi

Reaksi ini dimulai dengan DNA rantai ganda sebagai sumber cetakan (Gambar 2.1). Reaksi awal berupa reaksi denaturasi (“denaturation”) pada suhu tinggi yang memisahkan DNA rantai ganda. Dua primer berbeda kemudian menempel pada reaksi yang disebut penempelan primer (“annealing”). Primer menempel pada daerah ujung 5’ dari masing-masing rantai tunggal sedemikian rupa sehingga berada pada posisi yang berlawanan. DNA polymerase kemudian berperan dalam reaksi pemanjangan primer (“extention”) ke arah yang berlawanan. Reaksi pemanjangan ini memerlukan deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) sebagai sumber nukleotida untuk pemanjangan rantai. Reaksi terjadi dengan penambahan bufer reaksi yang sesuai dengan DNA polymerase yang digunakan.

Suatu reaksi PCR biasanya terdiri dari beberapa siklus dengan suhu yang berbeda-beda. Umumnya satu reaksi PCR didahului oleh satu reaksi denaturasi (90-95°C). Reaksi awal tersebut diikuti oleh beberapa siklus yang terdiri dari reaksi denaturasi, reaksi penempelan primer (tergantung T_m primer) dan pemanjangan primer (biasanya 72°C) kemudian ditutup kembali oleh satu reaksi pemanjangan (72°C). Hasil PCR dapat dianalisis lebih lanjut dengan metoda elektroforesis.

9.3 Bahan dan Alat

9.3.1 Bahan

1. DNA hasil isolasi (praktikum I) : 1 μ l
2. PCR mix menggunakan KAPPA 2g Fast (merk dagang) yang sudah mengandung komponen-komponen PCR MIX+DYE untuk elektroforesis (sehingga pada saat elektroforesis tidak usah memakai loading DYE ladi)
3. primer 1 μ M
4. Air deion steril ditambahkan pada no.1, 2 dan 3 sampai total reaksi 25 μ l

9.3.2Alat

1. Mesin PCR
2. Tabung eppendorf 0.2 ml
3. Mikropipet

4. Pipet Tip
5. Sentrifuga

9.4Tata kerja

1. Siapkan tabung eppendorf untuk PCR dan mikropipet beserta tip-nya.
2. Nyalakan mesin PCR sebelum menyiapkan komponen reaksi.
3. Masukkan ke dalam tabung eppendorf berturut-turut:
 - air deion
 - DNA target
 - primer
 - PCR mix (buffer, dNTPs, MgCl₂, enzim *Taq* polymerase) yang telah disiapkan untuk semua kelompok.
4. Sentrifuga tabung eppendorf sebelum memulai PCR.
5. Masukkan tabung eppendorf ke dalam mesin PCR. Mulailah reaksi sesuai dengan siklus yang diinginkan (Denaturasi awal pada suhu 94°C 2 menit, Diikuti 30 siklus: denaturasi selama 15 detik pada suhu 95°C, penempelan primer 30 detik pada 55°C dan pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 2 menit; siklus ini diikuti pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 7menit

Daftar Pustaka

- Williams, C., Williamson, R., Coulette, C., Loeffler, F., Smith, J., and Ivinson, A. (1988). Lancet, i, 102.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

