

# POLYMERASE CHAIN REACTION : UJI MOLEKULER DI MASA DEPAN

Widyasari Kumala

Bagian Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

## Pendahuluan

Akhir-akhir ini kemajuan teknologi di bidang rekayasa genetik dirasakan sangat maju dan berkembang dengan pesat. Teknik pengujian dengan DNA probe yang sudah dikenal sangat sensitif dan spesifik, masih ada kelemahannya karena membutuhkan jumlah sel, jaringan atau cairan tubuh lainnya dalam jumlah tertentu agar dapat terdeteksi. Bilamana bahan pemeriksaan yang didapat jumlahnya sangat sedikit, maka dilakukan pembiakan terlebih dahulu. Tetapi sering kali pembiakan tidak berhasil baik atau sulit tumbuh dalam medium pembiakan secara *in vitro* sehingga memerlukan suatu metode pemeriksaan yang lain yang lebih akurat, mudah, sensitif dan spesifik.

Pada tahun 1983, Kary B. Mullis menemukan metode yang mudah, sederhana dan efektif untuk mengatasi problem tersebut. Teknik baru ini adalah *Polymerase Chain Reaction* atau lebih dikenal dengan sebutan PCR.

PCR merupakan suatu metode untuk memperbanyak segmen DNA yang spesifik secara enzimatik dan cepat dalam *in vitro*. Setiap kali melakukan satu siklus PCR, DNA akan memperbanyak diri menjadi dua kali lipat. Dengan demikian bila dilakukan pemindahan 20 kali siklus, maka DNA yang diperoleh menjadi sebesar dua pangkat 20 atau sama dengan sejuta kali lipat (5, 8, 9, 11).

Nampaknya aplikasi metode PCR tidak terbatas dan masih berkembang terus, serta merupakan teknik yang sangat berharga di bidang biologi molekuler dan ilmu kedokteran.

Penerapan metode PCR antara lain untuk mendeteksi penyakit infeksi pada manusia yang disebabkan oleh mikroorganisme yang patogen seperti bakteri, virus, jamur dan parasit. Kloning gen DNA/ cDNA, *mutagenesis in vitro*, *genetic finger printing* yang banyak digunakan dalam ilmu kedokteran kehakiman, diagnosa dini penyakit, kelainan genetik pada *prenatal*, analisa sekuens, yang berbeda pada alel, analisa struktur transkrip RNA, *genomic foot printing* dan pengurutan (*sequencing*) nukleotida dari gen DNA/cDNA secara langsung (4, 8, 11).

Meskipun PCR merupakan suatu metode yang mempunyai daya kekuatan yang besar untuk memperbanyak segmen DNA yang spesifik, tetapi masih ada kekurangannya. Misalnya dapat terjadi kontaminasi pada DNA meskipun dalam jumlah yang sangat sedikit dan akan ikut diperbanyak,

sehingga akan memberikan hasil yang meragukan dan menyesatkan. Untuk mengatasinya, laboratorium yang mengerjakan metode PCR harus mempunyai ruangan cadangan yang terpisah dan masing-masing digunakan untuk persiapan reagen, pemrosesan PCR dan analisa hasil PCR. Reagen yang digunakan harus dibagi menurut kebutuhan secukupnya, pipet dan tabung reaksi digunakan harus yang sekali pakai langsung dibuang, tip pipet harus yang panjang (2, 4, 8).

Dalam makalah ini akan dibahas riwayat singkat PCR, cara kerjanya dan beberapa penerapannya di bidang penelitian dan di bidang kedokteran.

## Sejarah

Pada mulanya teori dasar *Polymerase Chain Reaction* pertama kali telah dikemukakan secara rinci oleh Kleppe dkk pada tahun 1971. Tetapi teori tersebut tidak membangkitkan perhatian dan tidak menarik kepentingan umum. Sampai pada pertengahan tahun 1980 ketika sarjana Kary B Mullis dan kawan-kawannya di Cetus mengembangkan PCR ke dalam suatu cara yang dapat digunakan untuk menghasilkan sejumlah besar kopi gen dari DNA tunggal (2, 5).

Enzim yang pertama-tama digunakan dalam proses PCR yaitu DNA polimerase dari fragmen Klenow yang dipanen dari bakteri *E.coli* (9). Enzim tersebut digunakan oleh Saiki et al pada tahun 1985; Mullis et al pada tahun 1986; Mullis dan Faloona pada tahun 1987. Tetapi karena enzim ini tidak tahan terhadap suhu yang panas, sedangkan proses PCR memerlukan suhu yang tinggi, sehingga perlu terus ditambahkan enzim tersebut selama proses berlangsung.

Kemudian pada tahun 1988 Saiki dan kawan-kawan menemukan enzim lain yang lebih stabil yaitu DNA polimerase yang diekstraksi dari bakteri *Thermus aquaticus* yang bersifat termofilik. Enzim ini dikenal dengan sebutan Taq Polymerase, bekerja optimal pada suhu 75°C dan masih stabil pada suhu 94<sup>o</sup>-95<sup>o</sup>C. Dengan penemuan enzim ini, proses PCR menjadi lebih mudah (2, 9, 11).

Selain enzim tersebut juga ditemukan enzim polimerase lain yang lebih tahan panas yaitu Vent DNA Polymerase yang diisolasi dari *Thermococcus litoralis*.

## Cara kerja

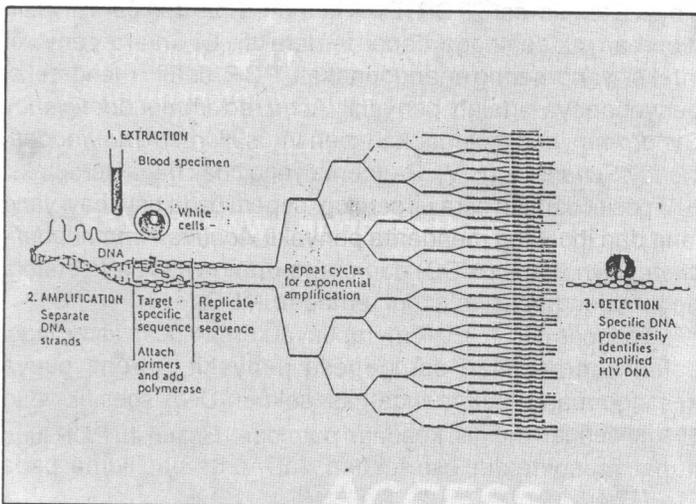
Pada dasarnya *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

merupakan suatu prosedur siklus biokimia untuk memperbanyak segmen DNA secara enzimatik. Pemeriksaan ini menggunakan enzim DNA polimerase yang stabil pada suhu tinggi. Hingga saat ini enzim yang sering digunakan adalah Taq polymerase dan Vent polymerase.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam suatu siklus PCR yaitu: Segmen DNA yang spesifik, enzim polimerase, primer yang terdiri dari oligonukleotida dan bahan-bahan pembangun DNA (dNTP).

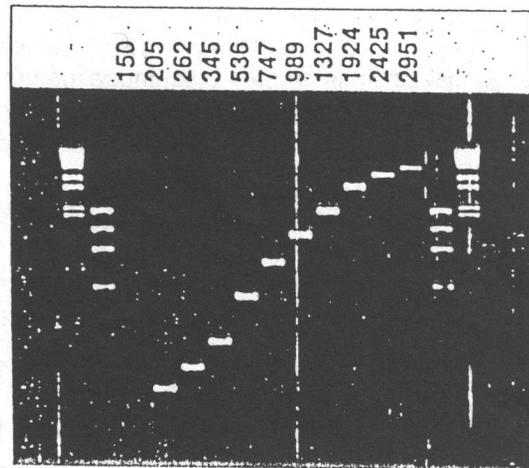
Tiap proses siklus PCR terdiri dari tiga tahapan yaitu: tahap I adalah denaturasi/pemisahan yang memerlukan suhu yang tinggi sekitar 94 - 95°C, untuk memisahkan untai DNA. Tahap II yaitu tahap renaturasi atau *primer annealing* di mana terjadi pendinginan. Suhu yang dibutuhkan sekitar 37 - 60°C selama beberapa puluh detik, dan terjadi penempelan primer pada ujung 5' atau 3' DNA yang akan diperbanyak. Setiap primer akan merupakan oligonukleotida yang terdiri dari untai tunggal dan urutan nukleotida. Primer dapat menempel pada DNA karena telah dibuat khusus, sehingga urutan basa-basanya merupakan urutan basa yang komplementer terhadap ujung bagian DNA yang akan diperbanyak. Tahap III yaitu pemanjangan atau *primer extension*. Dalam tahap ini perlu pemanjangan primer agar dapat terbentuk DNA untai ganda yang lengkap (Gambar 1). Pada proses ini memerlukan suhu yang tinggi sekitar 72°C, bila memakai enzim *T. aquaticus Taq* DNA Polymerase, sedangkan untuk enzim yang berasal dari *E. coli* hanya memerlukan suhu 37°C selama beberapa menit (2, 3, 8, 11).

Tiap proses satu siklus PCR berlangsung membutuhkan waktu sekitar 3-6 menit dan menghasilkan DNA dua kali lipat jumlahnya. Bila melakukan sejumlah X kali siklus PCR maka akan mendapatkan dua pangkat X kali lipat, sehingga dalam beberapa jam saja akan mendapatkan hasil jutaan kali lipat DNA yang spesifik. Tetapi tidak dianjurkan melakukan perbanyakkan lebih dari 40 kali siklus, karena akan terjadi efek pendaratan (*plateau*). Pada keadaan tersebut meskipun kita menambahkan siklus PCR, tidak akan menghasilkan DNA yang efektif seperti semula.



Gambar 1: Skema kerja PCR (3).

Untuk mengetahui berhasil tidaknya reaksi PCR, maka dapat dipakai berbagai metode, antara lain bila hasil amplifikasi DNA cukup banyak dipakai metode elektroforesis dengan pewarnaan etidium bromida. Metode ini yang paling sering digunakan. Hasil elektroforesis dapat diamati dengan menggunakan sinar ultra violet. Proses PCR berhasil baik bila terlihat pita atau bintik DNA seperti pada gambar foto di bawah ini (Gambar 2).



Gambar 2: Penampakan hasil PCR pada agarosa elektroforesis (II). Dengan pemberian zat etidium bromida. Pita DNA akan terlihat berwarna coklat di bawah sinar ultra violet pada agarosa. Bagian kiri dan kanan adalah *marker* (petanda) dengan panjang gelombang yang telah diketahui.

Metode elektroforesis tidak dapat menentukan identifikasi bila jumlah target pada awal urutan sangat kecil. Keadaan seperti ini mungkin masih dapat diperbanyak dari beberapa urutan-urutan nukleotida yang tidak spesifik dan menghasilkan DNA spesifik yang sangat sedikit untuk dapat dilihat. Oleh karena itu deteksi akhir hanya mengandalkan hibridisasi perbanyakkan DNA terdapat DNA sintetik prob.

**Beberapa Hal yang perlu diperhatikan dalam mengerjakan PCR:**

**\* Enzim Taq DNA Polimerase**

Meskipun enzim ini termasuk termotabil dan mempunyai daya tahan terhadap suhu yang sangat tinggi, tetapi untuk mendapatkan efisiensi yang besar, maka sebaiknya enzim ini tidak dimasukkan sebelum tahap denaturasi dimulai dan dianjurkan penambahan enzim sebaiknya sesudah tahap denaturasi pertama.

Penambahan enzim polimerase Taq DNA sebesar 2,5 u per reaksi dapat meningkatkan efisiensi PCR, tetapi hanya sekali saja penambahan enzim akan berefek. Penambahan enzim selanjutnya akan menghasilkan PCR yang non spesifik (2).

**\*Suhu dan Waktu**

Setiap tahap pada siklus PCR membutuhkan waktu yang seminimal mungkin, tetapi efektif. Bila waktu yang dipakai terlalu lama maka akan terjadi pemborosan dan kerusakan pada enzim polimerase DNA.

**\*Tahap Denaturasi**

Tahap ini merupakan tahap kritis, karena bila terjadi pemisahan untai yang sempurna terlalu cepat selama proses denaturasi, maka DNA akan mengalami pemanasan yang lebih lama dari waktu standar yang dibutuhkan yaitu 90 menit sehingga mengakibatkan DNA rusak.

Jika kandungan G-C sangat tinggi maka memerlukan temperatur yang lebih tinggi dari 94°C sehingga mengakibatkan efektifitas enzim polimerase *Taq* akan menurun dengan cepat.

**\*Tahap Penempelan (*Annealing*)**

Keadaan kritis terjadi bila primer tidak menempel dengan baik pada *template*. Primer dengan kandungan G-C yang rendah (<50%) membutuhkan temperatur yang lebih rendah dari 55°C untuk penempelan yang sempurna<sup>(2,4)</sup>.

**\*Tahap Pemanjangan (*Extention*)**

Tahap ini tergantung pada panjang sekuen yang ingin diperbanyak. Dalam waktu 3 menit sudah cukup untuk memperpanjang beberapa Kbp. Sebaliknya bila waktu lebih lama dari 15 menit tidak memperlihatkan hasil yang baik<sup>(3)</sup>.

**\*Kontaminasi**

Kontaminasi berupa urea, detergen SDS, sodium asetat, dan beberapa komponen yang terbawa sewaktu pemurnian DNA dengan agarosa gel dapat menurunkan efisiensi dari PCR<sup>(2,10)</sup>.

**Penerapan PCR di Bidang Penelitian**

PCR memiliki kemampuan yang sangat berguna dalam segala bidang dan situasi untuk memeriksa DNA. Dapat diramalkan bahwa PCR berguna secara luas dalam penelitian analisa genetik, seperti arkeologi dan patologi forensik yang sebelumnya selalu dihindari karena kesulitan teknis identifikasi<sup>(4)</sup>.

Dengan memperbanyak target DNA, PCR dapat mengganti atau menambah standar metode kloning yang baku, misalnya isolasi dan pelabelan fragmen DNA, *site specific mutagenesis*, *complementary DNA*, kloning gena, analisis interaksi protein DNA, pengurutan DNA/RNA dan manipulasi pengobatan dengan gen.

Mungkin lebih menggairahkan para peneliti dalam kemampuan mewujudkan manipulasi DNA dengan PCR yang sebelumnya memberikan kesulitan atau ketidakpastian. Triglia dan kawan-kawan menggunakan *Inverse PCR* pada gen yang mengkode prekursor antigen permukaan merosoid mayor dari *Plasmodium falciparum*. Dalam penerapan ini dilakukan pemotongan gen DNA dengan menggunakan *Rsal*. Setelah disambung membentuk lingkaran dengan enzim ligase, kemudian dipotong kembali dengan menggunakan enzim *HinfI*

untuk diperbanyak<sup>(7)</sup>.

Penerapan lainnya yang dilakukan oleh Silver dan Keerikatte untuk memperbanyak DNA seluler yang mengandung provirus ekotropik yang diintegrasikan ke dalam tikus<sup>(7)</sup>.

Salah satu keuntungan lainnya adalah dengan menggunakan metode *Alu* PCR, mampu mengisolasi dengan cepat DNA manusia yang diinsersi dari bahan klon<sup>(6)</sup>.

**Penerapan PCR Di Bidang Kedokteran**

Pada umumnya penerapan PCR di bidang kedokteran dapat dibagi 3 bidang, yaitu: (1) penyakit genetik, (2) infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen seperti: bakteri, virus, jamur dan parasit dan (3) keganasan.

Pemakaian PCR pertama kali pada penyakit anemia sel sabit yang juga merupakan penemuan PCR pertama kali oleh Kary B. Mullis. Hingga saat ini pemakaian PCR masih ditingkatkan terus.

Untuk mendiagnosa penyakit kelainan prenatal melalui amniosentesis sebaiknya dilakukan pada trimester kedua. Hal ini untuk menghindari efek radioaktif terhadap janin. Biopsi vilus khorion yang diambil pada trimester pertama kehamilan dapat dianalisa dengan cara *Colorimetrically* dalam waktu 6 jam.

Laboratorium Dr. Erlich telah membuat kemajuan yang pesat dalam penggunaan PCR untuk mempelajari gen *Human Histocompatibility* (HLA). Dengan demikian telah memberikan informasi yang berharga mengenai kecenderungan adanya kelainan genetik seperti penyakit *insulin dependent diabetes mellitus*, *rheumatoid arthritis*, *pemphigus vulgaris* dan yang lainnya. Selain diagnosa penyakit pada manusia PCR-HLA juga sangat berguna di bidang ilmu kedokteran kehakiman dan transplantasi jaringan<sup>(3,4)</sup>.

PCR sering dipakai untuk mendiagnosa penyakit yang disebabkan oleh infeksi mikroorganisme dalam jumlah yang sangat sedikit, sehingga mendapat kesulitan dalam pembiakan, maka dapat digunakan PCR untuk mendeteksinya. Dengan cara PCR, DNA kuman, virus dan parasit akan diperbanyak sehingga dapat terdeteksi. Di antara penyakit infeksi yang sering menggunakan PCR untuk mendeteksi penyebabnya adalah penyakit *Acquired Immunodeficiency Syndrome* yang di sebabkan oleh virus *Human Immunodeficiency Syndrome* (HIV). Penderita yang tidak dapat terdeteksi HIV positif dengan cara uji serologi, seperti pada bayi-bayi yang lahir dari ibu yang menderita penyakit *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) dan orang-orang yang HIV serologi negatif dengan risiko tinggi terhadap AIDS<sup>(4,8,10)</sup>.

Terlepas dari itu PCR mempunyai kemampuan yang tinggi dalam mempelajari patogenesis penyakit, karena punya kesanggupan untuk mendeteksi sekuen DNA spesifik yang sesuai dengan definisi keadaan patologik. Selain itu PCR juga dapat mengidentifikasi sekuen dari virus papilloma pada

ke halaman 14

menjadi pilihan pertama, mengingat testis merupakan organ yang sangat rentan terhadap kenaikan suhu yang relatif kecil, dan dalam tempo yang tidak terlalu lama.

### Daftar Pustaka

1. Aafjes J.H, Vreeburg, J.T.M. & Schneck, P.E. Serum gonadotrophins in rats after castration or heat treatment of the testis. *Acta Endocrinol*, 1978;88:260.
2. Bowler, K. The effect of repeated application of heat on spermatogenesis in rat. A histological study. *J. Reprod, Fertil*, 1972;28:325
3. Collins, P.M, Collins, W.P, Mcneilly, A.S., & Tsang, W.A., Plasma FSH LH and testosterone levels in the male rat during degeneration of the germinal epithelium caused by severe heat treatment or ligation of vasa efferentia. *J. Reprod. Fertil*, 1978;54:285.
4. Fahim, M.S., Fahim, Z., Harman, J., Thompson, I., Montie, J. & Hall, D.G. Ultrasound as a new method of male contraception. *Fertil, Steril*, 1977;28:823.
5. Fridd, C.W, Murphy, J., Linke, C.A., & Bonfligio, T.A. Response of rat testis to localized induced hyperthermia. *Urology*, 1975;5:76
6. Marlina, A. Pengaruh fisik terhadap spermatogenesis. *Prosiding Seminar Spermatogenesis Pengurus Besar Perkumpulan Andrologi Indonesia (PANDI)*, 1980;49-53.
7. Rock, J & Robnson, D. Effect of induced intrascrotal hyperthermia on testicular function in man. *Am. J. Obstet, Gynecol*, 1965; 93 : 793.
8. Robinson, D. & Rock, J. Intrascrotal hyperthermia induced by scrotal insulation: effect on spermatogenesis. *Obstet, Gynecol*, 1976;29:217.
9. Sartono, M.L. Pengaruh pemanasan testis secara berulang dengan menggunakan air terhadap kesuburan mencit. *Tesis Pascasarjana IKD-FKU*, 1988.
10. Tokuyama, I., Quoted by C.P. Leblond, E. Steinberger, E.C. Rusen Runge. Spermatogenesis in: Mechanism Concerned with conception. Edited by C.G. Hartman. Oxford, Pergamon, 1963; p.1.
11. Tjipto Suwandi. Kesehatan kerja dan programnya. *PELATIHAN HIPERKES DAN KESELAMATAN KERJA BAGI DOKTER-DOKTER, UNIVERSITAS AIRLANGGA*, 1995.
12. Koentjoro Soehadi. Sel-sel muda spermiogenesis pada ejakulat berbagai derajat (*grade*) penderita varikokel. *Maj. Androl. Ind*, 1995;11,1-2,31-36.
13. Fenster, H. Mc Loughlin M. Varicocele: Its role on Male Infertility, Treatment of Male in fertility edited Jerald Bain, Wolf-Bernhard Schill and Luis Schwarzstein, springer-verlag, Berlin Heidelberg New York, 1982; 209 - 218.
14. Moore, C.R, Quick, W.J. The scrotum as a Temperatur Regulator for the Testis, *American Journal Physiology*, 1991; 70 - 79.

### Polymerase...

dari halaman 10

keganasan konjungtiva dan kornea serta penyakit infeksi virus yang laten<sup>(1)</sup>.

### Kesimpulan

Teknik PCR merupakan satu prosedur yang dilakukan secara in vitro dan dapat memberikan manfaat yang besar di bidang penelitian dan kedokteran. Di samping itu PCR dapat mendeteksi penyebab penyakit infeksi yang disebabkan berbagai mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, jamur dan penyakit genetik serta keganasan. Hal ini dapat dikerjakan karena metode PCR terbukti dapat mengidentifikasi DNA dan memperbanyaknya.

### Daftar Pustaka

1. Adam, V., C. Moll, M. Schmid, C. Rodrigues, R. Moss, and J. Briner. 1996. Detection and typing of human papillomavirus in biopsy and cytological specimen by polymerase chain reaction enzyme analysis: methode
2. Ausbel, F.M, R. Brent, R.E. Kingston. Current protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1991: 15.03 - 15.1.7.
3. De Cresce RP, M.S Lifszit. PCR and the future of molecular testing. *Medical Laboratory observe*. 1993, 28-33.
4. Eisentein, B.I. The polymerase chain reaction, a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *The new England journal of medicine*. 1990. 18:178-182.
5. Mullis, KB., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. 4:36-43.
6. Nelson, D.L, and C.T. Caskey. 1989. Alu PCR: The Use of Repeat Sequence Primers for Amplification of Human DNA from Complex Sources. p. 113-117. In H.A. Erlich (ed). *PCR Technology, Principles and Application for DNA Amplification*. Stockton Press. New York.
7. Ochman, H., J.W. Ajioka, D. Garza, and D.L. Hartl. 1989. Inverse Polymerase Chain Reaction. P. 105-111. In H.A Erlich (ed). *PCR Technology, Principles and Applification for Amplification*. Stockton Press. New York.
8. Schochetman, G., C.y.Ou, and W.K. Jones. 1988. Polymerase Chain Reaction *J. Inf. Dis*. 158; 1154-1156.

### Ensefalopati...

dari halaman 7

### Daftar Pustaka

1. Elias E., Hawkin C. Portosystemic encephalopathy. In: *Lecture Notes on Gastroenterology*. Black Well Scientific 1985: 237-41.
2. Gani TA. Koma dan prekoma hepaticum Dalam: Ali Sulaiman, Daldijono, Nurul Akbar, Aziz Rani (edt). *Gastroenterologi Hepatologi*, InfoMedika, Jakarta 1009:354-63.
3. Hift R. Acute liver failure. In: Kirsch, R., Robson S., Meissner, P. (Edt). *Liver Update 1991*. MRC/UCT Liver Research Centre, Cape Town 1991:109-17.
4. Spiro HM. Hepatic encephalopathy. In: *Clinical Gastroenterology*. 4<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Inc. New York 1993:1184-7
5. Sherlock S, James D. *Disease of the Liver and Biliary system* 10<sup>th</sup> ed. Blackwell Sci. 1997 : 87-102.
6. Voigt M. Hepatic encephalopathy. In Kirsch R., Robson S., Meissner P. (Edt). *Liver Update 1991*. MRC / UCT Liver Research Centre, Cape Town 1991: 119-26.

