

LANGKAH-LANGKAH OPTIMASI PCR

Yuenleni¹

¹Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada. Email: yuenleni@ugm.ac.id,

Submisi: 20 Oktober 2018; Penerimaan 17 Juli 2019

ABSTRAK

Salah satu teknik analisa genetika adalah PCR (Polymerase Chain Reaction). Sebelum dilakukan PCR dengan sampel penelitian, perlu dilakukan optimasi agar didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal. Seorang Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) ataupun teknisi laboratorium dalam mendampingi peneliti atau mengerjakan penelitian dengan PCR seharusnya mengetahui langkah-langkah yang dilakukan jika sampel dan reagen sudah siap.

Tulisan ini diharapkan mampu memberikan gambaran kepada PLP-teknisi laboratorium ataupun peneliti baru yang akan mengerjakan penelitian dengan PCR.

Optimasi PCR bisa dilakukan dengan variasi komposisi PCR ataupun variasi tahapan PCR. Pada tulisan ini langkah-langkah PCR dijelaskan dengan contoh optimasi gena TCF7L2 (Transcription Factor 7-Like 2) dengan ukuran produk PCR 113 bp, optimasi ini dilakukan dengan variasi konsentrasi primer dan variasi tahapan PCR yaitu suhu annealing.

Penelitian ini dimulai dengan mengencerkan primer menjadi 100 uMol, kemudian membuat variasi konsentrasi primer yaitu 2,5 uMol, 5 uMol, dan 10 uMol. Suhu annealing (T_a) dihitung dari rata-rata suhu Melting (T_m) primer Forward dan Primer Reverse dikurangi 5, kemudian melakukan PCR dengan variasi primer dan variasi suhu annealing yaitu 47 °C, 49 °C, 51 °C, dan 53 °C. Produk PCR di elektroforesis dan didokumentasikan hasilnya dengan Gel document dan gambar hasil elektroforesis dibandingkan secara visual.

Produk PCR pada masing-masing konsentrasi primer dan masing-masing suhu annealing didapatkan band yang tebal, terang dan sesuai ukuran (target) dan konsentrasi primer yang menghasilkan band yang optimal adalah 2,5 uMol, dan Suhu annealing yang optimal adalah 53 °C.

Kata kunci: Elektroforesis; PCR; Optimasi.

PENDAHULUAN

Salah satu teknik analisa genetika adalah PCR (Polymerase Chain Reaction). Sebelum dilakukan PCR dengan sampel penelitian, perlu dilakukan optimasi agar didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal. Seorang Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) ataupun teknisi laboratorium dalam mendampingi peneliti atau mengerjakan penelitian dengan PCR seharusnya mengetahui langkah-langkah yang dilakukan jika sampel dan reagen sudah siap.

Tulisan ini diharapkan mampu memberikan gambaran kepada PLP-teknisi laboratorium ataupun peneliti baru yang akan mengerjakan penelitian dengan PCR.

PCR meliputi beberapa tahapan yaitu denaturasi, annealing dan ekstensi secara berulang, sedangkan komponen PCR meliputi *Template DNA*, primers, Taq DNA polymerase, PCR Buffer dan konsentrasi Mg^{2+} , Nucleotides (dNTPs) (Fatchiyah, 2005).

Pada langkah optimasi kita dapat bervariasi tahapan PCR baik waktu ataupun suhu, dan komposisi PCR.

Pada tulisan ini langkah-langkah PCR dijelaskan dengan contoh optimasi gena TCF7L2 (*Transcription Factor 7-Like 2*) dengan ukuran produk PCR 113 bp, optimasi ini dicontohkan dengan variasi konsentrasi primer dan variasi suhu *annealing*.

Variasi suhu *annealing* didapatkan dengan perhitungan rata-rata suhu *melting* (T_m) primer *Forward* dan Primer *Reverse* kemudian dikurangi 5, karena suhu *annealing* biasanya 5 °C di bawah T_m primer yang sebenarnya. Pada mesin PCR variasi suhu *annealing* ini dilakukan dengan memasukkan program *gradient*.

Produk PCR yang dihasilkan kemudian dielektroforesis. Hasil elektroforesis ini dianalisa dengan membandingkan ketebalan *band* secara visual. *Band* yang optimal yang dimaksud pada penelitian ini adalah *band* yang tebal, tunggal/*single* dan sesuai ukuran target.

Konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang menghasilkan *band* yang optimal inilah yang selanjutnya digunakan untuk PCR pada sampel penelitian.

TUJUAN

Tujuan penelitian ini adalah memberikan contoh langkah-langkah optimasi PCR sehingga didapatkan

- Konsentrasi Primer yang menghasilkan produk PCR dengan *band* yang optimal
- Suhu *annealing* yang menghasilkan produk PCR dengan *band* yang optimal

METODE

Alat

- Neraca analitik
- Microwave atau hot plate
- Pipet mikro 0.5-10 uL, 10-100uL, 100-1000uL

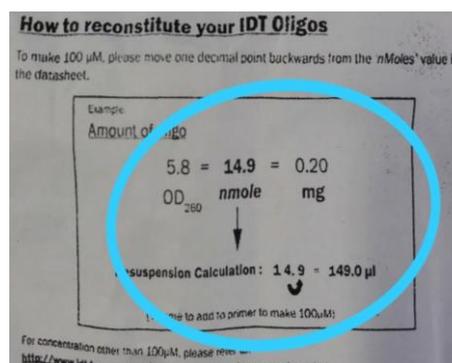
- Cetakan Gel
- Mesin Elektroforesis
- Gel Document
- Pena marker

Bahan

- Agarose
- ddH₂O
- Gotaq green mastermix
- Ladder
- Yellowtips, Blue tips, white tips
- Microtube 1.5 cc, 0,2 cc
- TE Buffer
- 0,5 X TBE Buffer

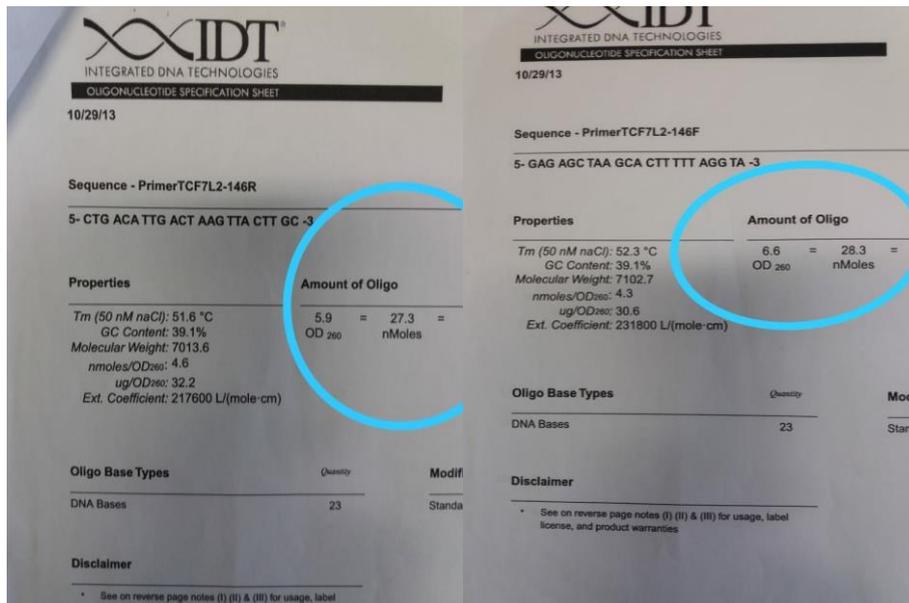
Cara Kerja

- Mengencerkan primer TCF7L2-Forward 5-GAG AGC TAA GCA CTT TTT AGG TA-3 menjadi konsentrasi 100uMol T_m 52.3 °C
- Mengencerkan primer TCF7L2-Reverse 5-CTG ACA TTG ACT AAG TTA CTT GC-3 menjadi konsentrasi 100 uMol T_m 51.6 °C
- Penambahan TE buffer sebagai pelarut sesuai dengan keterangan *datasheet* primer dengan mengalikan 10 pada *nmole*.



Gambar 1. Cara menghitung pelarut primer

Untuk primer TCF7L2-*Forward*, TE Buffer yang ditambahkan adalah 283 uL. Untuk primer TCF7L2 -*Reserve*, TE Buffer yang ditambahkan adalah 273 uL



Gambar 2. Datasheet dari primer TCF7L2

Pengenceran primer akan lebih bagus jika dengan tips yang berfilter untuk meminimalisir kontaminasi. Setelah dilarutkan sebaiknya di buat *aliquot* beberapa *tube* sehingga stok tidak keluar masuk dari penyimpanan. Penyimpanan primer yang telah dilarutkan pada suhu -20 °C.

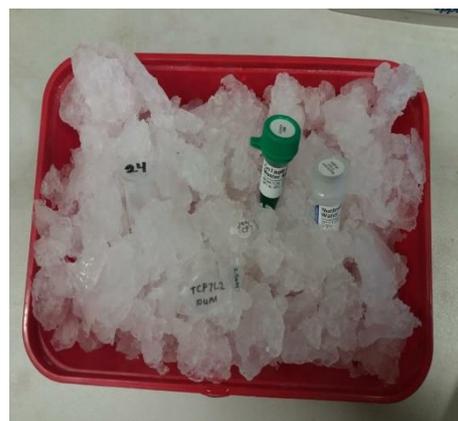
- 1) Membuat variasi primer 2.5 uMol, 5uMol, dan 10 uMol dengan mengencerkan primer stok 100 uMol
 - a) Konsentrasi primer 10 uMol : pipet 10 uL primer 100 uMol ditambahkan 90 uL ddH2O
 - b) Konsentrasi primer 5 uMol : pipet 50 uL primer 10 uMol ditambahkan 50 uL ddH2O
 - c) Konsentrasi primer 2,5 uMol : pipet 50 uL primer 5 uMol ditambahkan 50 uL ddH2O

Pada tube dituliskan nama gen dan konsentrasi masing-masing dengan pena marker

- 2) Membuat campuran PCR (PCR *mixture*)
 Komposisi sebagai berikut :
 Gotaq mastermix 15 uL
 ddH2O 9 uL
 Primer *Forward* 1uL

- Primer *Reverse* 1uL
- DNA template 23,5ug/ml, 4 uL
- Total volume 30 uL
- Tuliskan kode pada *microtube* dengan pena marker.

Pada proses pembuatan PCR *mixture* sebaiknya reagen untuk PCR ini sebaiknya di letakkan di atas es.



Gambar 3. Reagen dan sampel yang diletakkan pada es

Campuran reagen tidak perlu di vortex atau dicampur dengan pipetting cukup di-*spindown*, agar sampel dan reagen terkumpul di ujung *microtube* dengan alat seperti dibawah ini.



Gambar 4: Alat Spindown untuk campuran PCR

3) Mensetting program pada mesin PCR

- a) Pre denaturasi 95 °C selama 7 menit
- b) Denaturasai 95 °C selama 45 detik, annealing 47 °C—53 °C (*gradient*) selama 45 detik, Extensi 72 °C selama 45 detik ulangi sebanyak 35 siklus
- c) 72 °C selama 7 menit
- d) 12 C ∞

Setiap mesin PCR memiliki cara pengoperasian yang berbeda, mintalah bantuan kepada petugas penanggung jawab mesin untuk pertama kali pengoperasian PCR.

4) Pembuatan Agarose

- a) Timbang 2 gram agarose,
- b) Tambahkan 100ml TBE 0,5 X
- c) Gojok, dan panaskan menggunakan microwave selama 2 menit sampai larutan terlihat jernih
- d) Tunggu larutan mencapai suhu 50 °C- 60 °C
- e) Tambahkan 2 uL floresafe, campur
- f) Tuang ke dalam cetakan gel yang sudah terpasang
- g) Tunggu agarose gel mengeras, kurang lebih 30 menit

5) Elektrforesis Hasil PCR (produk PCR)

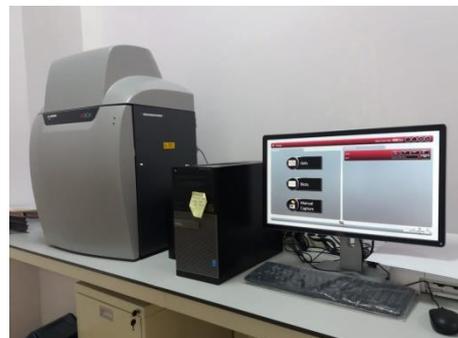
- a) Masukkan buffer TBE 0.5X pada tangki mesin elektroforesis

- b) Masukkan agarose gel ke dalam tangki elektroforesis sampai agarose tenggelam

- c) Masukkan 3 uL Ladder pada sumuran
- d) Masukkan 5 ul Produk PCR
- e) Tutup tangki mesin elektroforesis
- f) Catat urutan sampel yang dimasukkan
- g) Setting program 100 V selama 25 menit
- h) Matikan mesin elektroforesis, buka tutup tangki
- i) Ambil gel, Foto dengan menggunakan *gel document*



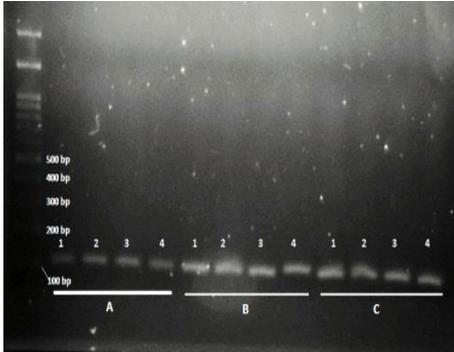
Gambar 5. Contoh mesin elektroforesis



Gambar 6. Contoh alat Gel Document

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil



Gambar 7. Hasil elektroforesis, A Produk PCR dengan konsentrasi primer 2,5 uMol, B. Produk PCR dengan konsentrasi primer 5 uMol, B. Produk PCR dengan konsentrasi primer 10 uMol, 1. Produk PCR dengan suhu annealing 47 °C, 2. Produk PCR dengan suhu annealing 49 °C, 3. Produk PCR dengan suhu annealing 51 °C, 4. Produk PCR dengan suhu annealing 53 °C

Pada gambar 7, hasil elektroforesis gena TCF7L2 didapatkan band pada 113 bp. Produk PCR pada setiap konsentrasi primer yaitu 2.5 uMol, 5 uMol dan 10 uMol band terlihat jelas. Begitu juga pada tiap-tiap suhu annealing yaitu 47 °C, 49 °C, 51 °C dan 53 °C band juga terlihat jelas. Ladder juga teripisah dengan baik namun demikian pada ladder dengan ukuran 100 bp dan 200 bp terlihat kurang jelas.

Pembahasan

Pada optimasi ini digunakan produk DNA dengan konsentrasi 23,5 ug/ml. Pada elektroforesis hasil PCR, yang dimaksud *band* yang optimal adalah *band* yang tebal, bersih dan sesuai ukuran (target). Gambar 7, menunjukkan pada semua konsentrasi primer yaitu 2.5 uMol, 5 uMol dan 10 uMol didapatkan gambar pita/*band* yang jelas dan sesuai target, meskipun *band* pada *ladder* dengan ukuran 100 bp kurang jelas. Menurut Padmalatha,

konsentrasi primer yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dapat menyebabkan tidak terjadinya amplifikasi. Semakin tinggi konsentrasi primer bisa menyebabkan *band* yang tebal tetapi kadang diikuti *band* yang tidak spesifik (*unspecific band*).

Pada semua variasi suhu *annealing* 47 °C, 49 °C, 51 °C dan 53 °C didapatkan gambar band yang jelas. Pada suhu *annealing* yang terlalu rendah, *non specific band* akan teramplifikasi yang menyebabkan *multiple band* pada hasil elektroforesis. Dan jika suhu *annealing* terlalu tinggi kadang hasil kurang jelas (Rychlik, dkk 1990).

Hasil optimasi sebaiknya dicobakan untuk beberapa sampel penelitian dulu, tidak langsung pada seluruh sampel penelitian, karena konsentrasi DNA yang dioptimasi bisa saja berbeda dengan konsentrasi produk DNA pada seluruh sampel penelitian.

Langkah optimasi ini selalu dilakukan untuk setiap gena yang akan di PCR karena kondisi sampel, reagen dan alat-alat yang ada pada setiap laboratorium berbeda-beda.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- 1) Konsentrasi primer yang menghasilkan *band* yang optimal adalah 2,5 uMol,
- 2) Suhu *annealing* yang menghasilkan band yang optimal adalah 53 °C.

Saran

- 1) Perlu dicoba elektroforesis dengan 50 bp DNA Ladder sehingga menghasilkan band yang jelas sampai ukuran target 113 bp.
- 2) Optimasi selain sesuai yang dicontohkan juga bisa dilakukan pada komposisi dan tahapan PCR yang lain.

Daftar Pustaka

Fatchiyah, 2005, PCR:Dasar teknik amplifikasi DNA dan aplikasinya.

<http://fatchiyah.lecture.ub.ac.id/teaching-responsibility/general/>

Patmalatha,K & Prasad, MNV, 2006. Optimization of DNA Isolation &PCR protocol for RAPD Analisis of Selected Medicinal and aromatic Plant of

Conservation Concern from Peninsular India. African Journal Biotechnology S. p.230-234

Rychlik W, WJ Spencer, RE Rhoads, 1990.Optimization of The Annealing Temperature for DNA amplification in vitro, Nucleic acids Research, Vol.18 No.21 P.6409