

Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Retno Setyawati¹, Siti Zubaidah²

¹Departemen Reproduksi dan Pemuliaan Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, email: retno.setyawati@ugm.ac.id

²Departemen Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, email: s.zubaidah@ugm.ac.id

Submisi: 28 April 2021; Penerimaan: 2 Juli 2021

ABSTRAK

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Setiap gen mempunyai primer dengan konsentrasi dan suhu annealing yang berbeda, sehingga perlu dilakukan optimasi konsentrasi primer dan suhu annealing agar didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi primer gen Leptin yang menghasilkan produk PCR dengan band yang optimal dan suhu annealing sampel DNA sapi Peranakan Ongole yang menghasilkan produk PCR dengan band yang optimal. Penelitian ini menggunakan sampel darah sapi yang mengandung gen Leptin dengan ukuran produk PCR 467 bp. Penelitian ini sudah dilakukan optimasi variasi penggunaan konsentrasi primer dan suhu annealing. Penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi primer 5 μ M dan 10 μ M yang berasal dari primer stok 100 μ M, sedangkan suhu annealing PCR yang digunakan yaitu 56°C, 58°C, 60°C, dan 62°C yang dihitung berdasarkan (T_m-5)°C dari rata-rata primer forward dan reverse. Produk PCR kemudian di elektroforesis dan dicek hasilnya pada UV transiluminator. Gambar hasil elektroforesis kemudian dibandingkan secara visual. Hasil yang didapat dari penelitian ini yaitu produk PCR gen Leptin yang menghasilkan band yang optimal dihasilkan pada konsentrasi primer 10 μ M dan suhu annealing 58°C.

Kata Kunci: Gen leptin; konsentrasi primer; suhu annealing; PCR

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA (McPherson and Moller, 2006) Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Sebelum dilakukan PCR dengan sampel penelitian, perlu dilakukan optimasi agar didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal. Seorang teknisi laboratorium

dalam mendampingi penelitian atau mengerjakan penelitian dengan PCR seharusnya mengetahui tahapan yang dilakukan jika sampel dan reagen sudah siap untuk dianalisa.

Tulisan ini diharapkan mampu memberikan gambaran kepada teknisi laboratorium ataupun peneliti baru yang akan mengerjakan penelitian amplifikasi DNA sampel darah khususnya darah sapi Peranakan Ongole (PO) menggunakan metode PCR .

PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi *template* (94 – 95°C), *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target (50 – 60°) dan pemanjangan (72°C). Faktor-faktor yang menentukan keberhasilan PCR diantaranya adalah 1) konsentrasi dan kualitas DNA, 2) temperatur *annealing* dari kedua primer, 3) konsentrasi MgCl₂, 4) enzim polimerase, 5) konsentrasi dan kualitas primer, 6) jumlah siklus PCR, 7) *deoksinukleotida triphosphate* (dNTP), dan faktor lain seperti larutan buffer (Gelfand and White, 1990).

Pada tahapan optimasi PCR kita dapat membuat variasi tahapan PCR baik waktu, suhu dan komposisi PCR. Pada tulisan ini kami menggunakan contoh optimasi gen Leptin pada DNA Sapi dengan ukuran produk PCR 467bp, dengan variasi konsentrasi primer dan suhu *annealing*. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan (Tm-5)°C sampai dengan (Tm +5)°C (Handoyo dan Rudiretna, 2001). 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* optimal yang dimaksud adalah *band* yang tebal, tunggal/*single* dan sesuai ukuran target (Irmawati, 2003). Konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang menghasilkan *band* yang optimal inilah yang selanjutnya digunakan untuk PCR pada sampel penelitian.

Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui: a) Konsentrasi primer gen Leptin yang menghasilkan produk PCR dengan *band* yang optimal, b) Suhu *annealing* sampel DNA sapi Peranakan

Ongole yang menghasilkan produk PCR dengan *band* yang optimal.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah mesin PCR *Wealtec SEDI-G*, *erlenmeyer glass* 250 ml, *micropipet nichipet* 0.5-10µl, *micropipette nichipet* 5-50 µl, *micropipet nichipet* 20-100µl, *microwave*, gelas ukur 100 ml, *plate* dan sisir (*comb*), *gloves*, *gel try*, MUPID-2 *Mini Gel Electroforesis System* (Gambar 4), *power supply*, *parafilm*, UV *transiluminator* UVP TEM-40, USA (Gambar 5), gunting, kamera digital, pena marker dan timbangan analitik merk Ohaus PA213.

Bahan yang digunakan adalah sampel DNA sapi Peranakan Ongole, agarose, 1 x TBE Buffer, *white tip*, *yellow tip*, *microtube* 1,5 ml, *microtube* 0,2 ml, My Taq™ HS Red mix.2x, *ethidium bromide*, *loading dye*, *ladder* 100bp, dan *double destilated water*.

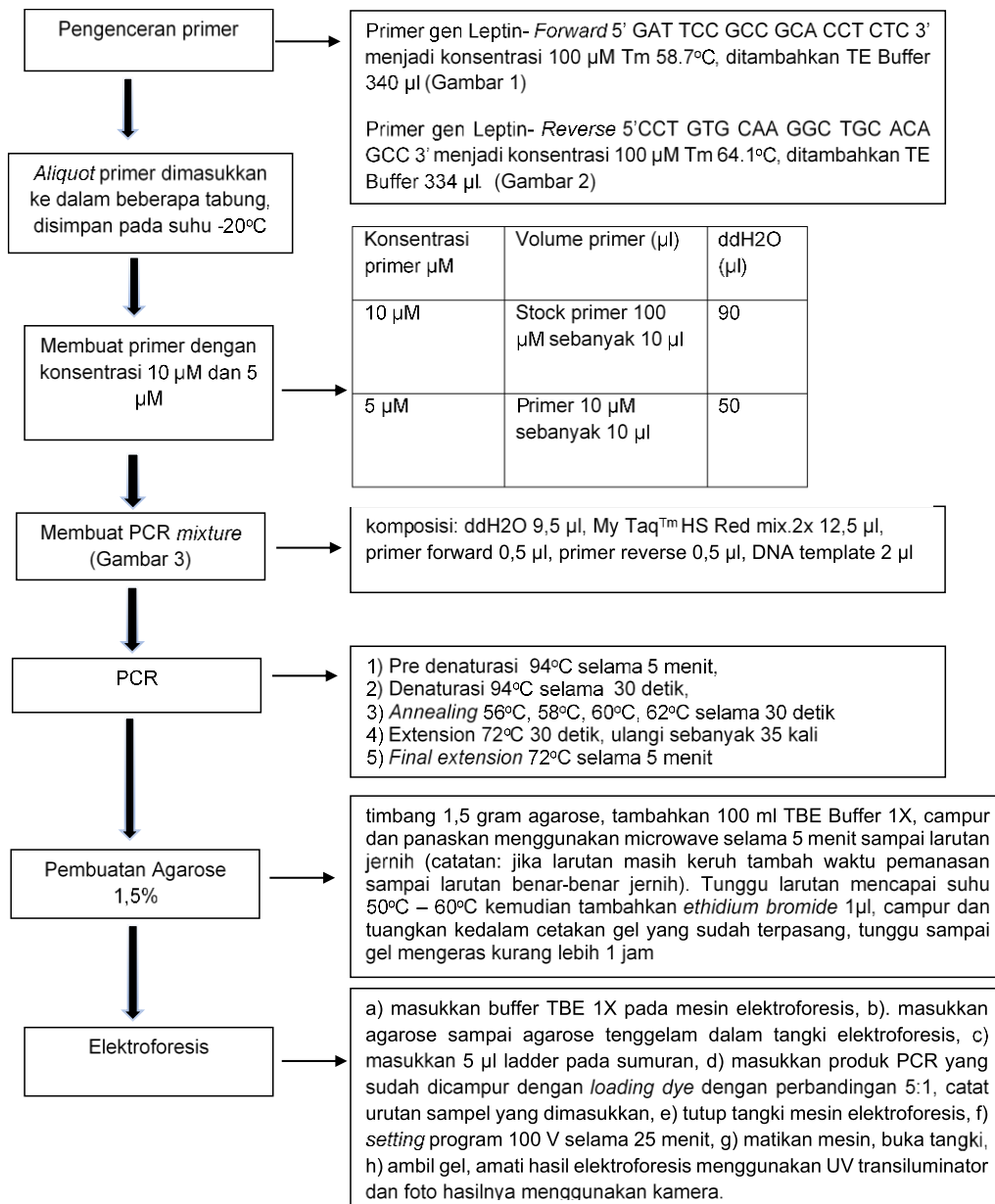
Metode

Properties	Amount Of Oligo
Tm (50Mm NaCl) 50.64 °C	3.2= 34 = 0.18
GC Content 46.7%	0.260 mmole mg
Molecular Weight 2371.5	For 100 µM add 340 µl
Ext. Coefficient 133,400 L/mol*cm	

Gambar 1. Datasheet primer Forward gen Leptin

Properties	Amount Of Oligo
Tm (50Mm NaCl) 46.1 °C	6.3= 33.4 = 0.21
GC Content 46.7%	0.260 mmole mg
Molecular Weight 2372	For 100 µM add 334 µl
Ext. Coefficient 139,700 L/mol*cm	

Gambar 2. Datasheet dari primer Reverse gen Leptin



Gambar 3. Diagram alir percobaan



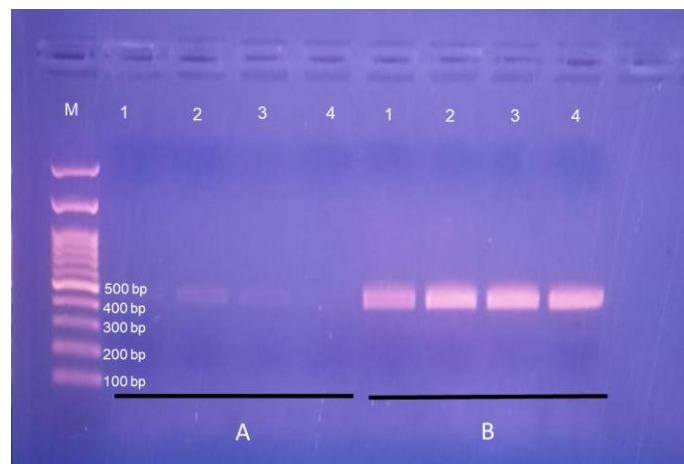
Gambar 4. Reagen dan sampel pada blok es



Gambar 5. Mesin elektroforesis



Gambar 6. Alat UV transiluminator



Gambar 7. Hasil elektroforesis sampel PCR gen Leptin pada konsentrasi Primer 5 μM (A), 10 μM (B) dan variasi suhu annealing 56° (1), 58°C (2), 60°C (3) dan 62°C (4), M (Marker).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pada Gambar 7, kode A merupakan hasil elektroforesis DNA produk PCR dengan konsentrasi primer 5 μM , dan kode B merupakan hasil elektroforesis DNA produk PCR dengan konsentrasi primer 10 μM . Angka 1, 2, 3, dan 4 merupakan hasil elektroforesis DNA Produk PCR gen Leptin dengan suhu *annealing* 56°C, 58°C, 60°C, dan 62°C. Hasil elektroforesis DNA gen Leptin didapatkan *band* 467bp. Produk PCR pada konsentrasi primer 5 μM terlihat tipis, sedangkan pada konsentrasi primer 10 μM *band* terlihat tebal, bersih dan sesuai ukuran target yaitu 467bp. Pada suhu *annealing* 56°C, 58°C, 60°C, 62°C *band* terlihat tebal, jelas, dan juga ukuran sesuai target, *Ladder* juga terpisah dengan baik.

Pembahasan

Pada optimasi ini digunakan produk DNA dengan konsentrasi 0,0278 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hal ini sesuai dengan pendapat Sambrook *et al.* (1989) yang menyatakan bahwa konsentrasi DNA sebesar 0,01-0,1 μg setiap μl larutan *template* sudah cukup baik untuk PCR. *Band* yang tebal, bersih, dan sesuai ukuran target pada hasil elektroforesis merupakan hasil yang optimal. Pada Gambar 7 menunjukkan bahwa pada konsentrasi primer 10 μM didapatkan *band* yang jelas dan sesuai target dibandingkan dengan konsentrasi primer 5 μM . Konsentrasi primer yang terlalu rendah dan tinggi dapat menyebabkan tidak adanya amplifikasi dan juga bisa menyebabkan pembentukan *primer dimer* (keadaan dimana *band* yang terbentuk diikuti oleh

band lain yang tidak spesifik) (Padmalatha dan Prasad, 2006).

Hasil PCR yang menggunakan suhu *annealing* 58°C menghasilkan *band* yang paling tebal, lebih terang, jelas dan tunggal/*single* dibandingkan pada suhu *annealing* 56°C, 60°C, dan 62°C (Gambar 7). Suhu *annealing* sangat berpengaruh terhadap proses penempelan primer pada *template* DNA. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak menempel dengan baik pada *template* hal ini ditandai dengan semakin tipisnya *band* yang terbentuk, sedangkan suhu *annealing* yang rendah menyebabkan primer akan menempel pada situs penempelan yang tidak spesifik yang kemudian akan menyebabkan teramplifikasinya fragmen lokus yang tidak diinginkan (Pertiwi *et al.*, 2015). Menurut Irmawati (2003) mengatakan bahwa pita DNA yang tebal dan tunggal/mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam ependorf, disentrifus, atau bahkan karena temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu. Tahapan optimasi PCR ini dilakukan untuk setiap gen yang akan di PCR karena kondisi sampel, reagen dan alat-alat yang digunakan disetiap laboratorium berbeda-beda.

KESIMPULAN

Konsentrasi primer yang optimal pada gen Leptin dengan metode PCR adalah 10 µM dan suhu *annealing* adalah 58°C. Penelitian ini dilakukan untuk memudahkan peneliti dalam melakukan PCR menggunakan sampel darah sapi Peranakan Ongole karena metode PCR merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam biologi molekular karena cepat, murah dan sederhana.

DAFTAR PUSTAKA

- Handoyo, D dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. 9 (1): 17-29.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery. Thesis. Bogor: IPB
- McPherson, M. J and Moller, S. G. 2006. PCR. Second Edition. Published by: Taylor and Francis Group. UK. ISBN 0-203-00267-9.
- Padmalatha, K dan Prasad, M.N.V. 2006. Optimization of DNA Isolation dan PCR protocol for RAPD Analisis of Selected Medicinal and aromatic Plant of Conservation Concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology*. 5 (3): 230-234.
- Pertiwi, N.P.N., Mahardika, I.G.N.K dan Watininiasih, N.L. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae (DOTTYBACK) untuk Identifikasi Spesies Secara Molekular. *Jurnal Biologi*. 19(2): 1-5.
- Sambrook, J, Fritsch E.F, and Maniatis, T. 1989. *Molekular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.