MODUL PRAKTIKUM

AMPLIFIKASI GEN APOLIPOPROTEIN E MENGGUNAKAN *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA
2020

PETUNJUK UMUM

1. Tujuan Melakukan Praktikum

Melihat sendiri hasil praktikum.

Membandingkan hasil percobaan dengan pendapat-pendapat/teori-teori yang ada dan kemudian mengambil kesimpulan akhir.

Membantu dalam mempelajari efek yang ditimbulkan / diharapkan.

2. Cara Pelaksanaan

Modul Praktikum digunakan sebagai pegangan dalam pelaksaan praktikum secara mandiri.

Pada setiap kegiatan selalu dilakukan pencatatan pada buku catatan harian (log book).

Pada setiap pelaksanaan praktikum, selalu didampingi oleh dosen dan analis laboratorium.

3. Penilaian/Evaluasi

Penilaian dilakukan terhadap proses dan hasil akhir praktikum yang dilakukan.

Pada akhir pelaksanaan praktikum dilakukan pembuatan laporan praktikum.

4. Aturan Pelaksanaan

Lakukan praktikum sebaik-baiknya dan dengan tertib.

Adakan persiapan secukupnya tiap kali akan melakukan praktikum, agar percobaan-percobaan yang dilakukan dapat bermanfaat.

Ambillah pelajaran sebanyak mungkin dari percobaan yang dilakukan.

Berhati-hatilah menggunakan alat-alat dan bahan-bahan praktikum.

PRAKTIKUM AMPLIFIKASI GEN APOLIPOPROTEIN E MENGGUNAKAN *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

PENGANTAR

Polymerase Chain Reaction (PCR) atau reaksi polimerase berantai merupakan suatu metode in vitro yang terjangkau, sederhana, dan sensitif untuk memperbanyak atau amplifikasi sekuens DNA atau molekul RNA yang diinginkan. Banyak produk (sampai beberapa milligram fragmen DNA utas ganda) dihasilkan di tahap akhir dari setiap PCR, dan banyak variasi eksperimen dan aplikasi lanjutan yang telah ditemukan terkait kemampuan teknik PCR ini untuk menghasilkan DNA utas ganda dalam skala yang besar (Najafov A, 2017).

Penggunaan dari PCR ini meliputi klasifikasi dari organism, proses penentuan genotip, arkaeologi molekular, mutagenesis, deteksi mutasi, sekuensing, penelitian kanker, deteksi patogen, DNA *fingerprinting*, penemuan obat, pencocokan genetic, dan diagnosis prenatal. Penggunaan luas dari PCR ini didapatkan dari spesifisitas dan kemampuannya untuk mendeteksi meskipun hanya molekul DNA tunggal dan memproduksi jutaan kopi DNA dari sekuens yang ditargetkan (Najafov A, 2017).

KOMPONEN PCR

Ada enam komponen dasar yang digunakan dalam siklus PCR yaitu sebagai berikut:

a. Template DNA/RNA

   Template atau cetakan yang berisi sekuens DNA atau RNA target yang akan diamplifikasi (misalnya DNA genomik, plasmid, amplikon) (Najafov A, 2017).

b. Pasangan primer

   Oligonukleotida yang menentukan sekuens yang akan diamplifikasi. Apabila konsentrasi primer meningkat, spesifisitas reaksi akan menurun dan efisiensi reaksi meningkat (Najafov A, 2017). Adapun formula berikut ini dapat digunakan untuk mengkalkulasi dari kemungkinan bahwa sekuens secara tepat bersifat komplementer terhadap nukleotida yang terjadi dari kesempatan dalam sekuens DNA yang meliputi sekuens random dari nukleotida. Saat mendesain primer untuk PCR berlaku aturan yaitu (Verma K, 2014):

   - Desain primer yang memiliki kandungan G-C 50-60%
   - Berusaha agar Tm di antara 55-60°C.

- Hindari struktur sekunder. Sesuaikan lokasi primer, sehingga berlokasi di luar struktur sekunder pada sekuens target, apabila diperlukan.
- Hindari pengulangan dari G atau C lebih panjang dari 3 pasangan basa dan tempatkan G dan C di ujung primer.
- Lakukan pengecekan sekuens dari primer forward dan reverse untuk meyakinkan tidak ada komplementer di ujung 3'.
- Hindari formasi primer-dimer.

c. Deoxynucleotide Triphosphate (dNTP)

Deoxynucleotide Triphosphate (dNTP) atau nukleotida yang berisikan grup trifosfat, yaitu suatu blok pembangun yang menjadi sumber bagi DNA polymerase untuk mensintesis rantai DNA baru. Jumlah yang sama dari empat dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) termasuk dalam reaksi, biasanya pada konsentrasi 0,2 mM (200 μM) setiap kali reaksi (Verma K, 2014).

d. Thermostable DNA polymerase

DNA polymerase adalah enzim yang mengkatalisasi dari reaksi. Awalnya, DNA polymerase yang digunakan pada PCR diisolasi dari bakteri Escherichia coli. Akan tetapi, oleh karena PCR melibatkan siklus multipel dari pengaturan temperature yang mendenaturasi dan menonaktifkan DNA polymerase E. coli, sehingga peneliti secara manual menambahkan aliquot baru enzim di awal permulaan setiap siklus. Setelah penemuan dari PCR, terdapat penemuan baru yaitu thermostable DNA polymerase yang saat ini secara umum disebut dengan "Taq" yang diisolasi dari Thermus aquaticus, suatu bakteri yang hidup di air panas. Selanjutnya, thermostable DNA polymerase diisolasi dari banyak strain bakteri lainnya (misalnya Pfu, Tma, dan KOD). Temperatur optimal untuk aktivitas Taq yaitu antara 75-80oC dan waktu paruh dari enzim ini pada 95oC yaitu 40 menit. Taq tidak memiliki aktivitas proofreading (3'-5' exonuclease), oleh karena itu frekuensi dari mutasi yang terjadi pada produk PCR adalah 1 berbanding 200.000 per nukleotida per duplikasi DNA. Untuk Untuk aplikasi di mana keakuratan DNA polymerase amat sangat penting, polymerase seperti Pfu dan Pwo digunakan. DNA polymerase ini memiliki aktivitas proofreading (3'-5' exonuclease) dan tingkat akurasi berkisar 10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan tingkat akurasi dari Taq DNA polymerase (Najafov A, 2017).

e. Buffer untuk mempertahankan keasaman (pH)

Cairan buffer, menyediakan lingkungan kimia yang sesuai untuk aktivitas optimal dan stabilitas dari DNA polymerase. Kebanyakan buffer mengandung Tris dengan konsentrasi 10 mM dan KCl dengan konsentrasi 50 mM. pH bervariasi dari 8,2 hingga

9,0 (25oC). Oleh karena itu, pH 9,0 pada 25oC diterjemahkan menjadi mendekati pH 7,6 pada 72oC, di mana adalah temperatur optimal untuk aktivitas polymerase. pH 7,0-7,5 dipertimbangkan optimal untuk Taq polymerase (Verma K, 2014).

f. Magnesium chloride

Magnesium adalah kation yang berikatan dengan polymerase dan adalah kofaktor yang esensial terhadap aktivitas polymerase. Semakin rendah konsentrasi magnesium, akan semakin ketat kondisi untuk annealing primer. Perubahan sebanyak 0,25 mM dapat bermakna perbedaan antara hasil yang baik dari produk sesuai dengan panjang yang diharapkan atau tidak menghasilkan produk sama sekali (Verma K, 2014).

A. TAHAPAN PROSES PCR

Tahapan siklus PCR menyerupai pola proses replikasi alamiah dari DNA dalam sel. Dua primer akan menentukan sekuens target untuk diamplifikasi. Kedua primer akan berhibridisasi ke arah yang berlawaran dari rantai DNA untuk menginisiasi titik sintesis dari utas DNA baru. *DNA polymerase* yang *thermostable* seperti *Taq DNA Polymerase* akan mengkatalisasi sintesis. Setiap ronde sintesis PCR akan melibatkan tiga proses utama yakni denaturasi, *annealing* dan ekstensi. Ketiga proses utama ini akan diulang-ulang beberapa kali. Sifat repetitif PCR adalah kunci dari kekuatan proses amplifikasi. Oleh karena produk ekstensi primer yang disintesis pada siklus yang ditentukan akan menjadi *template* pada saat siklus selanjutnya, maka jumlah kopi DNA target akan berlipat ganda setiap siklusnya. Hal ini berarti apabila dilakukan sebanyak 20 siklus, maka PCR dapat memproduksi sekitar 1 milyar (2^{20}) kopi DNA target (Roche, 2006).

Secara umum, PCR meliputi suatu seri dari ssiklus perubahan temperatur yang berulang, dengan setiap siklus yang meliputi tahapan penentuan temperatur yang diskret, biasanya sebanyak tiga. Siklus ini biasanya diawali oleh langkah penentuan temperatur tunggal pada suhu tinggi (>90°C) dan diikuti oleh proses akhir dari ekstensi produk (**Tabel 1)**. Adapun tahapan siklus PCR secara lengkap digambarkan dalam **gambar 1** yang dijabarkan sebagai berikut:.

a. Tahap inisialisasi

   Tahap ini meliputi proses pemanasan hingga suhu 94-96°C, yang dilakukan sekitar 2-8 menit. Hal ini bertujuan untuk memicu aktivitas dari *DNA polymerase* yang membutuhkan aktivasi panas (Verma K, 2014).

b. Tahap denaturasi

   Tahap ini adalah langkah pertama dari siklus repetitive utama PCR dan meliputi proses pemanasan hingga suhu 90-98°C selama 20-30 detik. Hal ini akan menyebabkan pemisahan rantai utas ganda DNA karena adanya pemutusan ikatan hydrogen di antara basa-basa komplementer, yang akan menghasilkan molekul utas tunggal DNA. *Template* DNA utas ganda terdenaturasi pada temperatur yang disesuaikan dengan kandungan G-C. Denaturasi untuk 45 detik pada 94-95°C secara rutin dilakukan untuk amplifikasi molekul DNA linear yang memiliki kandungan G-C <55% dan suhu yang lebih tinggi digunakan untuk DNA target yang memiliki kandungan G-C >55%. Pemanjangan periode denaturasi tidak diperlukan untuk molekul DNA linear (Verma K, 2014).

c. Tahap *annealing*

   Tahap *annealing* selalu dilakukan pada suhu 3-5°C lebih rendah dari kalkulasi temperatur untuk denaturasi di mana primer oligonukleotida akan terdisosiasi dari *template*. Temperatur

reaksi *annealing* diturunkan hingga mencapai 55-70°C selama 20-40 detik yang memungkinkan penempelan primer ke utas tunggal *template* DNA. Ikatan hydrogen DNA-DNA yang stabil hanya dapat terbentuk apabila sekuens primer cocok dengan sekuens *template* DNA. Enzim polimerasi menempel pada *primer-template hybrid* dan memulai pembentukan DNA (Verma K, 2014).

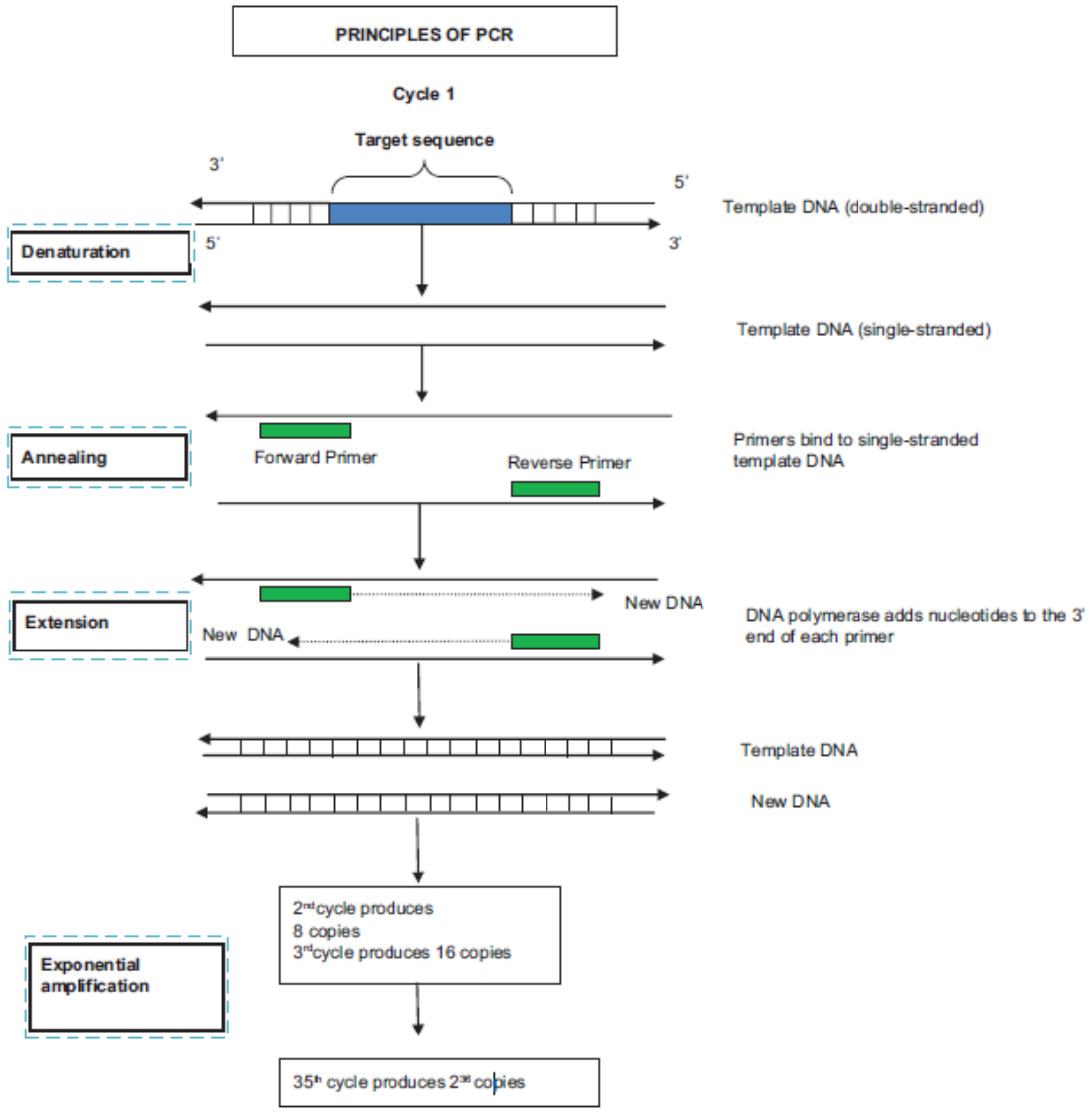
d. Tahap ekstensi/elongasi

Ekstensi dari primer oligonukleotida dilakukan pada suhu yang mendekati suhu optimal untuk sintesis DNA yang dikatalisasi oleh *thermostable polymerase*. Suhu pada tahap ini tergantung dari *DNA polymerase* yang digunakan; *Taq polymerase* memiliki aktivitas optimum pada suhu 70-78°C. Pemanasan pada 72°C selama 45 detik adalah suhu yang ideal bagi enzim polymerase untuk bekerja. Pada tahap ini, *DNA polymerase* mensintesis rantai DNA baru yang komplementer dengan rantai *template* DNA dengan menambahkan dNTP yang komplementer dengan *template* sesuai arah ujung 5' ke 3', mengkondensasi grup 5'-*phosphate* dari dNTP dengan grup 3'-*hydroxyl* di ujung rantai DNA (Verma K, 2014).

Pada akhir siklus PCR yang pertama, akan ada dua utas DNA baru yang identik dengan *template* originalnya. Siklus ini dapat diulang berkali-kali dan melipatgandakan jumlah utas DNA yang dihasilkan. Jumlah siklus yang dibutuhkan untuk amplifikasi tergantung dari jumlah kopi *template* DNA yang ada pada saat awal reaksi dan efisiensi dari ekstensi primer dan amplifikasi. Jumlah pengulangan siklus biasanya berkisar 30-40 kali, sehingga hasil akhirnya dapat didapatkan hingga milyaran kopi dari DNA target dalam waktu hanya beberapa jam. Sekuens target biasanya berkisar dari panjang 100 hingga 2000 pasangan basa yang paling umum digunakan dalam amplifikasi PCR (Roche, 2006; Verma K, 2014).

Tabel 1. Pengaturan temperatur dalam setiap tahapan siklus PCR

Tahapan	**Temperatur**	**Waktu**
Inisialisasi	96°C	5 menit
Denaturasi	96°C	30 detik
Annealing	68°C	30 detik
Ekstensi/elongasi	72°C	45 detik



Gambar 1. Tahapan siklus PCR

B. AMPLIFIKASI GEN APOLIPOPROTEIN E

Apolipoprotein (apo) E adalah bagian protein dari suatu lipoprotein yang berfungsi untuk mengangkut lipid dan untuk menstabilisasi struktur dari lipoprotein. Apolipoprotein E juga mengaktivasi enzim yang berpartisipasi pada metabolisme lipoprotein dan mengenali reseptor endotelial yang berhubungan dengan jalur pensinyalan inflamasi.

Bahan:

- DNA template (DNA genomik)
- *Primer* forward dan reverse (5' TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA dan 5' GCCCCGGCCTGGTACACTGCCA)
- Mastermix
- H_2O dan *buffer* yang sesuai

Prosedur Kerja:

Adapun prosedur kerja yang dilakukan untuk mengamplifikasi gen apolipoprotein E menggunakan PCR yaitu:

- Larutkan primer apolipoprotein E *forward* 5' TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA sebanyak 28,1 nmol ditambahkan 281 µL TE sehingga didapatkan konsentrasi 100 µM.
- Larutkan primer apolipoprotein E *reverse* 5' GCCCCGGCCTGGTACACTGCCA sebanyak 37,4 nmol ditambahkan 374 µL TE sehingga didapatkan konsentrasi 100 µM.
- Encerkan primer dari stok 100 µM menjadi *working solution* 10 µM dengan cara menambahkan 5 µL dari stok dengan 45 dH_2O.
- Optimasi dilakukan dengan rentang suhu *annealing* 65, 67, 69^oC.
- Membuat PCR *mix* dengan volume 35 µL menggunakan *GoTaq® Green Master Mix* sebanyak 17,5 µL, H_2O 11,9 µL, primer *forward* 1,4 µL, primer *reverse* 1,4 µL yang dimasukkan ke dalam masing-masing tabung yang telah diberikan nomor sampel, kemudian

ditambahkan masing-masing DNA genomik sampel sebanyak 2,8 µL ke dalam tabung dengan nomor sampel yang sesuai.

- Amplifikasi gen target dilakukan menggunakan alat *Applied Biosystems Veriti* 96-*Well Thermal Cycler* dengan suhu denaturasi awal 94°C, denaturasi 94°C, *annealing* 69°C, ekstensi 70°C, dengan pengulangan denaturasi, *annealing* dan ekstensi sebanyak 40 kali, serta suhu ekstensi final yaitu 70°C.
- Produk PCR yang telah berisi gen target apolipoprotein E yang telah teramplifikasi dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut sepeti pemeriksaan elektroforesis gel ataupun sekuensing.

DAFTAR PUSTAKA

Atawodi SE, Atawodi JC, Dzikwi AA. 2010. Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. Sahel Medical Journal. 13(2): h. 54-63. doi: 10.4314/smj2.v13i2.64834

Delong RK, Zhou Q. 2015. Experiment 6 - Polymerase Chain Reaction (PCR) dalam Introductory Experiments on Biomolecules and their Interactions. London: Academic Press. h. 59-66. doi: 10.1016/B978-0-12-800969-7.00006-2

Garibyan L, Avashia N. 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR) J Invest Dermatol. 133(3):e6. doi: 10.1038/jid.2013.1

Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N. 2016. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. Journal of Indian Society of Periodontology. 20(2): h. 128-135. doi: 10.4103/0972-124X.176391

Najafov A, Hoxhaj G. 2017. Chapter 1 – Introduction dalam PCR Guru: An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologists. London: Academic Press. h. 1-6. doi: 10.1016/B978-0-12-804231-1.00001-8

Roche. 2006. Chapter 1 Introduction dalam PCR Aplications Manual (edisi ke-3). Jerman: Roche Diagnostic GmbH. h. 9

Verma K, Dalal J, Sharma S. 2014. Scientific concepts of polymerase chain reaction (PCR). IJPSR. 5(8): h. 3086-95. doi: 0.13040/IJPSR.0975-8232.5(8).3086-95