

MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI MOLEKULER
“PCR DAN ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA”



Uhamka
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

Oleh Dr. Suci Lestari, M.Pd.

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA
2023

PCR DAN ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA

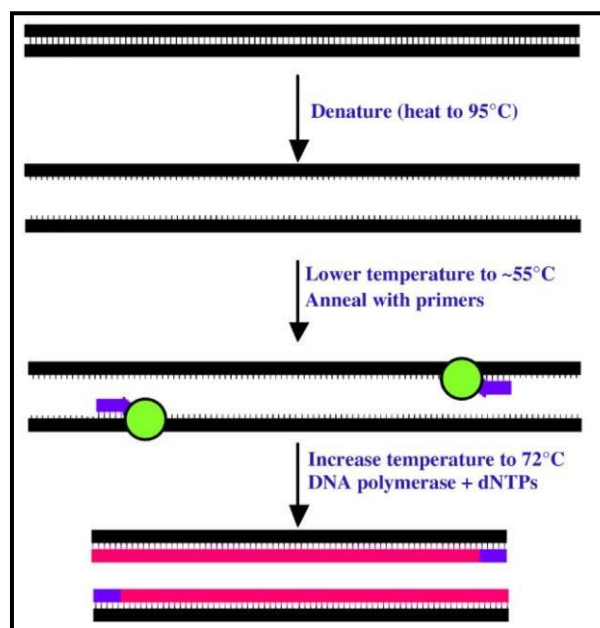
Capaian Pembelajaran

1. Mahasiswa mampu menjelaskan tahapan pada reaksi polimerasi berantai atau *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.
2. Mahasiswa mampu mengorelasikan prinsip pemisahan molekul DNA dengan struktur DNA pada saat elektroforesis gel agarosa.
3. Mahasiswa mampu mengaitkan aplikasi PCR dan elektroforesis gel agarosa di bidang biologi.

Pendahuluan

Reaksi polimerisasi berantai atau lebih dikenal sebagai *Polymerase Chains Reaction (PCR)* merupakan metode dasar untuk amplifikasi asam nukleat di bidang biologi molekuler. Saat ini, PCR merupakan teknik molekuler yang paling banyak digunakan di laboratorium riset. Metode amplifikasi asam nukleat yang saat ini berkembang dan digunakan adalah menggunakan prinsip siklus termal. Teknik siklus termal menggunakan pemanasan berulang untuk mempercepat proses sintesis DNA sehingga menghasilkan jumlah sintesis DNA baru yang lebih banyak daripada cetakan DNA di awal (Kalendar et al. 2017). Selain menggunakan teknis siklus termal, amplikasi DNA juga dapat menggunakan teknik isothermal yang tidak memerlukan beberapa siklus termal untuk sintesis DNA baru. Salah satunya adalah metode *loop-mediated isothermal amplification (LAMP)* (Notomi et al. 2000)

Amplifikasi menggunakan teknik PCR memiliki siklus termal yang terdiri atas tiga (3) tahap, yaitu denaturasi cetakan DNA pada suhu tinggi, 90-95°C, penempelan primer pada suhu 55-60 °C, dan ekstensi hibridisasi cetakan DNA dengan primer untuk sintesis untai DNA baru pada suhu 72 °C (Gambar 1.) Jumlah produk DNA baru yang disintesis bergantung pada berapa banyak siklus yang dilakukan dalam PCR. Umumnya siklus PCR berkisar antara 30-40 siklus sehingga dengan rumus 2^n , n =jumlah siklus, maka jumlah DNA hasil sintesis berkisar antara 1.073.741.824- 10.995.116.000.000.000.000 salinan DNA (Edel 2008). Sementara itu, untuk mengetahui apakah amplifikasi DNA berhasil atau tidak diamplifikasi, maka metode pengamatan visual menggunakan elektroforesis gel agarose dapat digunakan (Walker-Daniels 2012).



Gambar 1. Tahapan pada PCR

Aplikasi PCR banyak digunakan untuk berbagai bidang, salah satunya adalah untuk mendeteksi keberadaan materi genetik dari suatu sampel. Bidang diagnostik untuk mendeteksi keberadaan materi genetik virus saat ini banyak menggunakan PCR. Visualisasi gen penanda keberadaan virus dapat menggunakan elektroforesis gel agarosa. Pendekatan *in-silico* memungkinkan PCR dan visualisasi dilakukan tanpa harus melakukan kegiatan secara langsung di laboratorium. Program FastPCR (Kalendar et al. 2017) merupakan program berbasis Java yang dapat digunakan untuk melakukan PCR secara *in-silico*. Sementara itu, perangkat lunak Snapgene dapat digunakan untuk memvisualisasikan elektroforesis gel agarosa. Pada modul akan dilakukan simulasi PCR dan elektroforesis gel dari beberapa gen yang menjadi penanda untuk deteksi SARS-COV2.

Tinjauan Pustaka

Komponen PCR

1. Cetakan DNA (*DNA template*)

Sumber cetakan DNA untuk PCR dapat berupa DNA genom (gDNA), DNA komplemen (cDNA), dan DNA plasmid. Jumlah molekul cetakan DNA yang digunakan harus memerhatikan perbandingan antara cetakan DNA dengan primer yang digunakan. Jumlah cetakan DNA untuk PCR berkisar 1-1000ng atau 10^4 - 10^7 molekul DNA (Lorenz 2012).

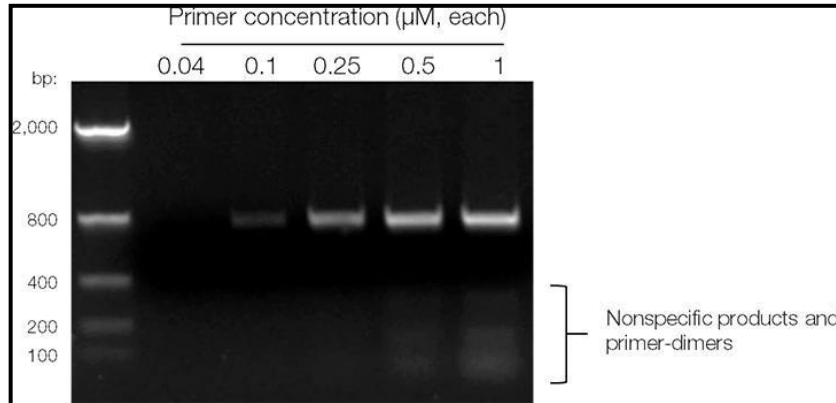
2. Enzim polimerisasi DNA (*DNA polymerase*)

Enzim DNA polimerase I *Eschericia coli* pertama kali digunakan dalam proses PCR. Akan tetapi, karena tidak stabil pada suhu tinggi kemudian digantikan oleh enzim dari *Thermus aquaticus* (*Taq*) yang memiliki waktu paruh pada suhu 95°C selama 40 menit (Perl-Verkuil et al. 2008). Saat ini, sudah banyak DNA polimerase dari beberapa organisme yang sudah dijual secara komersil. Beberapa contoh DNA polimerase yang diperoleh selain *Thermus aquaticus* (*Taq*) adalah *rTth* dan *Tth* dari *Thermus thermophilus* serta DyNzyme dari *Thermus brockianus* (Rådström et al. 2003).

3. Primer

Molekul nukleotida sintesis sebanyak 15-30 basa (oligonukleotida) digunakan sebagai primer pada PCR. Primer menyediakan gugus hidroksil pada ujung 3' sehingga DNA polimerase dapat melakukan sintesis DNA pada saat PCR. Urutan primer dapat menentukan spesifitas produk PCR sehingga perlu memerhatikan beberapa syarat sebelum disintesis. Pertama, Panjang berkisar 15-30 basa. Primer yang pendek menyebabkan produk tidak spesifik. Sementara itu, primer yang panjang berpotensi membentuk struktur sekunder. Kedua, suhu luruh (T_m) berkisar 55-70°C dengan perbedaan antara primer forward dan reverse maksimal 5°C. Ketiga, persentase GC berkisar 40-60% dengan distribusi merata tidak boleh lebih dari tiga (3) basa G atau C pada ujung 3' (Perl-Verkuil et al. 2008).

Konsentrasi primer primer dalam PCR yang optimal adalah 0,1-1,0 μ M. Primer dengan konsentrasi tinggi akan menghasilkan produk yang tidak spesifik dan gagal menempel di gen target. Sementara itu, konsentrasi yang rendah juga akan menghasilkan produk yang sedikit atau tidak ada produk dari gen target (Gambar 2.) (Haris 1998).



Gambar 2. Variasi konsentrasi primer dan produk PCR yang dihasilkan (Sumber: Thermofisher Scientific)

4. Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)

Sintesis DNA pada PCR memerlukan *building blocks* berupa dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP. Umumnya pada reaksi PCR, *building blocks* tersebut disediakan dalam bentuk dNTP dengan konsentrasi dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP yang sama satu sama lain. Konsentrasi masing-masing penyusun dNTP pada reaksi PCR adalah 20-200 μM pada 100 μL reaksi PCR. Akan tetapi jumlah tersebut tidak absolut bergantung dengan kebutuhan reaksi PCR dan keberadaan kofaktor (Perl-Verkuil et al. 2008).

5. Kofaktor

Aktivitas DNA polymerase pada PCR dipengaruhi oleh keberadaan kofaktor berupa ion divalent magnesium (Mg^{2+}). Prinsip kerja Mg^{2+} adalah mengkatalis pembentukan ikatan fosfodiester antara ujung hidroksil 3' di primer dengan gugus fosfat pada dNTP. Konsentrasi Mg^{2+} perlu dioptimasi, karena konsentrasi yang tinggi dapat menghambat proses amplifikasi pada PCR (Perl-Verkuil et al. 2008).

6. Bufer

Larutan bufer berperan untuk memfasilitasi reaksi optimum pada saat amplifikasi di PCR. Terutama untuk meningkatkan spesifitas dari DNA polimerase pada saat hibridisasi primer dengan cetakan DNA. Aktivitas optimum DNA polimerase memiliki pH 8,0-9,5. Tris-HCL merupakan bufer yang umum digunakan pada PCR (Perl-Verkuil et al. 2008).

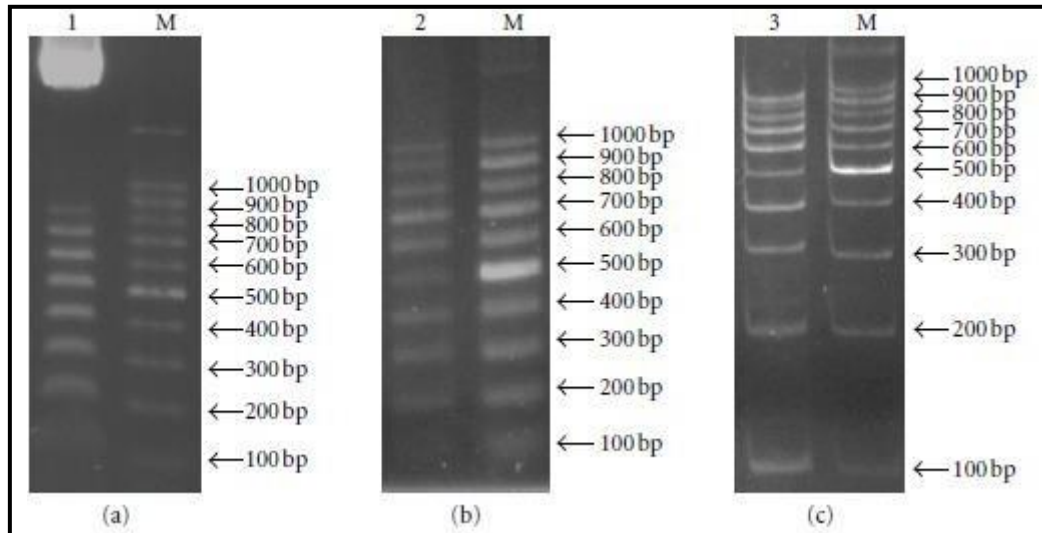
Prinsip Dasar Elektroforesis Gel Agarosa

Pemisahan molekul DNA dapat dilakukan dengan menggunakan metode yang relatif murah dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Selain gel agarose, gel akrilamid juga dapat digunakan untuk memisahkan molekul DNA. Ada dua (2) jenis elektroforesis yang digunakan untuk memisahkan molekul DNA, yaitu metode vertical dan horisontal. Pemisahan molekul DNA menggunakan gel agarosa lebih efektif dan efisien jika dilakukan menggunakan metode horizontal, karena lebih sedikit gel yang dibutuhkan dan lebih mudah dilakukan (Katoch 2011).

Molekul gel agarosa membentuk ikatan hidrogen dan ukuran pori-pori gel bergantung dengan konsentrasi molekul agarosa. Oleh karena itu, ukuran, bentuk, kemurnian dan homogenitas molekul dapat diamati (Katoch 2011). Larutan bufer digunakan untuk menjalankan elektroforesis gel, umumnya adalah bufer TAE pH 8,2. Selain itu juga perlu pewarnaan sehingga DNA dengan menggunakan EtBr sehingga dapat diamati dalam UV dengan panjang gelombang 302nm dan 590nm (Holtzhauer 2006).

Ukuran molekul DNA yang dipisahkan melalui elektroforesis gel agarosa dapat ditentukan dengan membandingkan menggunakan marka DNA (*DNA ladder*). *DNA ladder* dapat diperoleh secara komersil atau dibuat dengan menggunakan fragmen DNA dari lamda, virus

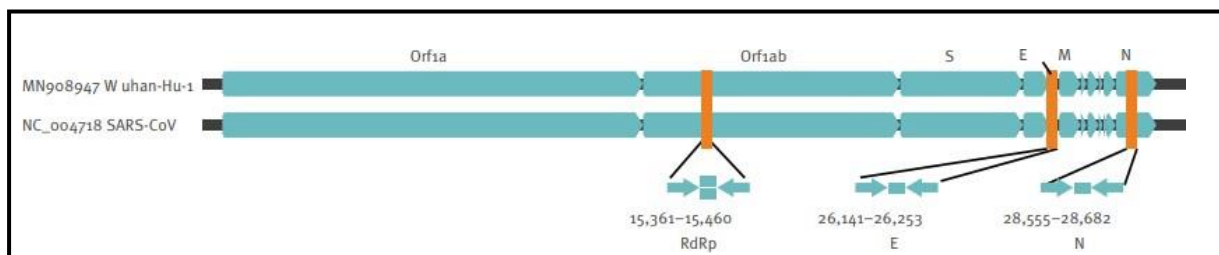
simian, dan plasmid yang telah dipotong-potong menggunakan enzim restriksi. Sebagai contoh, produksi marka DNA 100bp dengan menggunakan plasmid pGEM-800 menghasilkan ukuran fragmen DNA dari 100-1000 pasang basa dipotong menggunakan enzim *Sma*I (Gambar 3.) (Lan et al. 2012).



Gambar 3. Produk marka DNA 100 pasang basa menggunakan pGEM-800. Keterangan gambar: a. dan b. gel agarose, c. gel poliakrilamid (Sumber: Lan et al. 2012)

Gen Penanda SARS-COV2

Penyakit *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) pertama kali dideteksi pada tahun 2019 di Wuhan dan saat ini masa menjadi pandemi. Identifikasi menggunakan gen *RNA dependent RNA polymerase* (RdRp) menunjukkan SARS-CoV-2 mengalami diversifikasi dari kelompok Betacoronavirus dari kelelawar dan trenggiling. Hal tersebut menunjukkan gen RdRp dapat digunakan sebagai gen penanda yang stabil untuk identifikasi kelompok Betacoronavirus (Kasibhatla et al. 2020). Selain gen RdRp, terdapat dua (2) gen lain yang menjadi target untuk mengidentifikasi SARS-CoV-2, yaitu gen E dan gen N. Kedua gen tersebut merupakan gen structural yang mengode selubung (E) dan nucleocapsid (N) (Gambar 4.) (Corman et al. 2020).



Gambar 4. Struktur genom virus SARS-CoV-2 (Sumber: Corman et al. 2020)

Metode

Alat

1. Komputer.
2. Perangkat lunak FastPCR dan Snapgene.

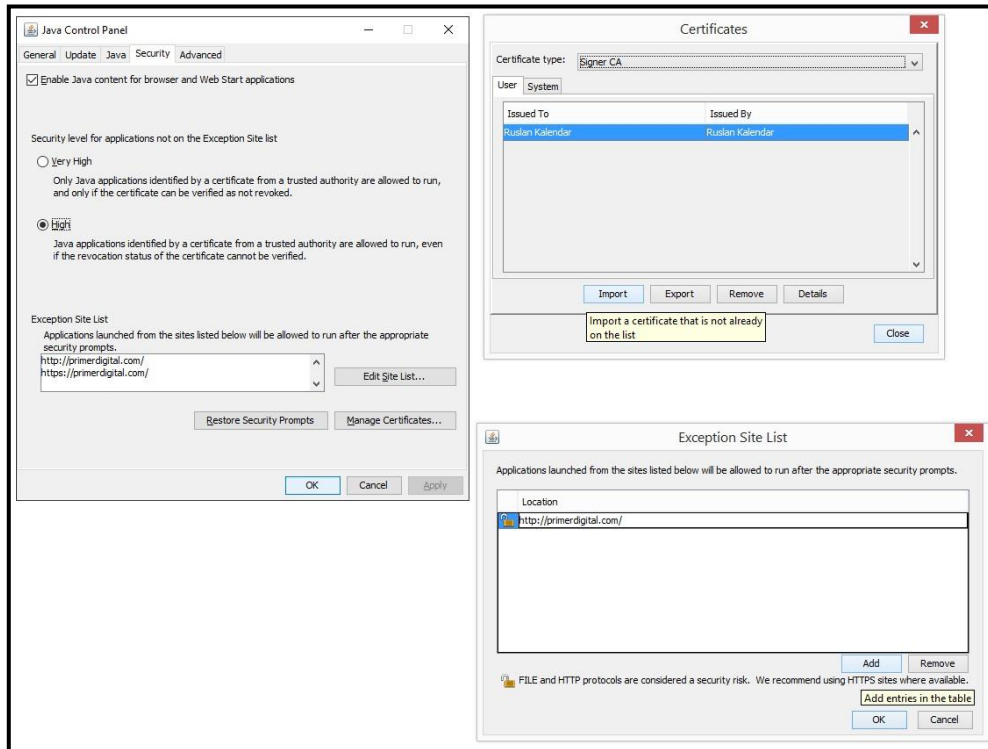
Bahan

1. Urutan nukleotida dari NCBI.

Cara Kerja

Instalasi Java Runtime dan FastPCR

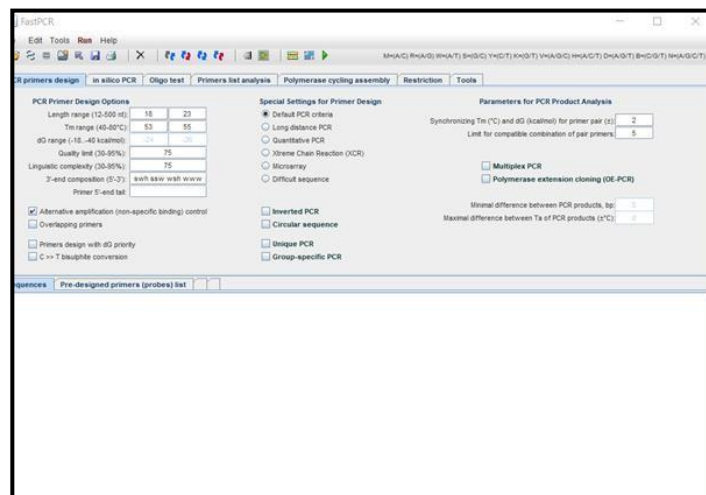
1. Perangkat lunak Java Runtime diunduh dari laman <https://www.oracle.com/java/technologies/javase-jdk16-downloads.html>
2. Pilih sistem operasi Windows dan kemudian diinstal.
3. Perangkat lunak FastPCR diunduh pada laman <https://primerdigital.com/tools/>
4. Jika aplikasi tidak dapat digunakan maka lakukan pengaturan “Java Control Panel” kemudian ikuti pengaturan seperti pada Gambar 5. berikut.



Gambar 5. Pengaturan java runtime untuk menjalankan perangkat FastPCR.

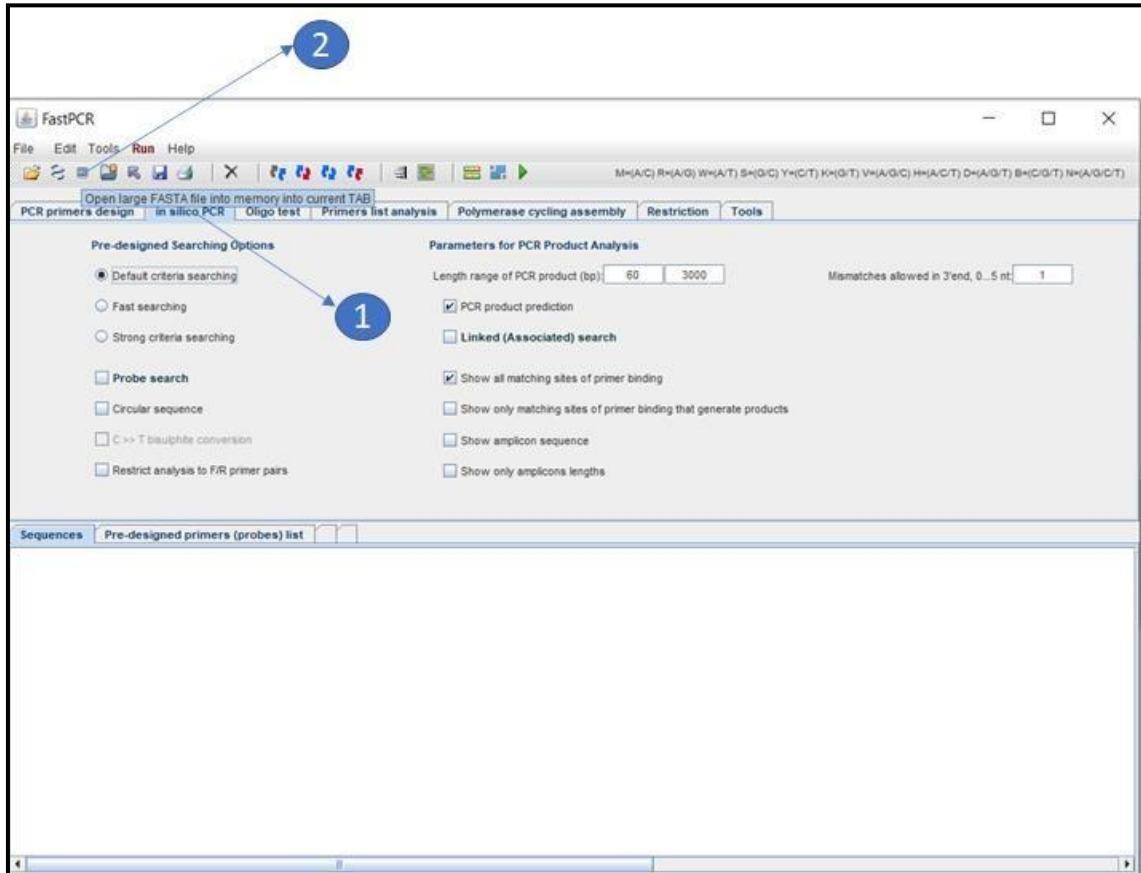
Simulasi PCR menggunakan FastPCR

1. Buka perangkat lunak FastPCR yang telah diinstal sehingga muncul tampilan seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Tampilan antarmuka FastPCR

- Pilih “*in silico PCR*” dan kemudian input file “Sample 1.txt” melalui pilihan “*Open large FASTA file into memory into content TAB*” seperti Gambar 7.

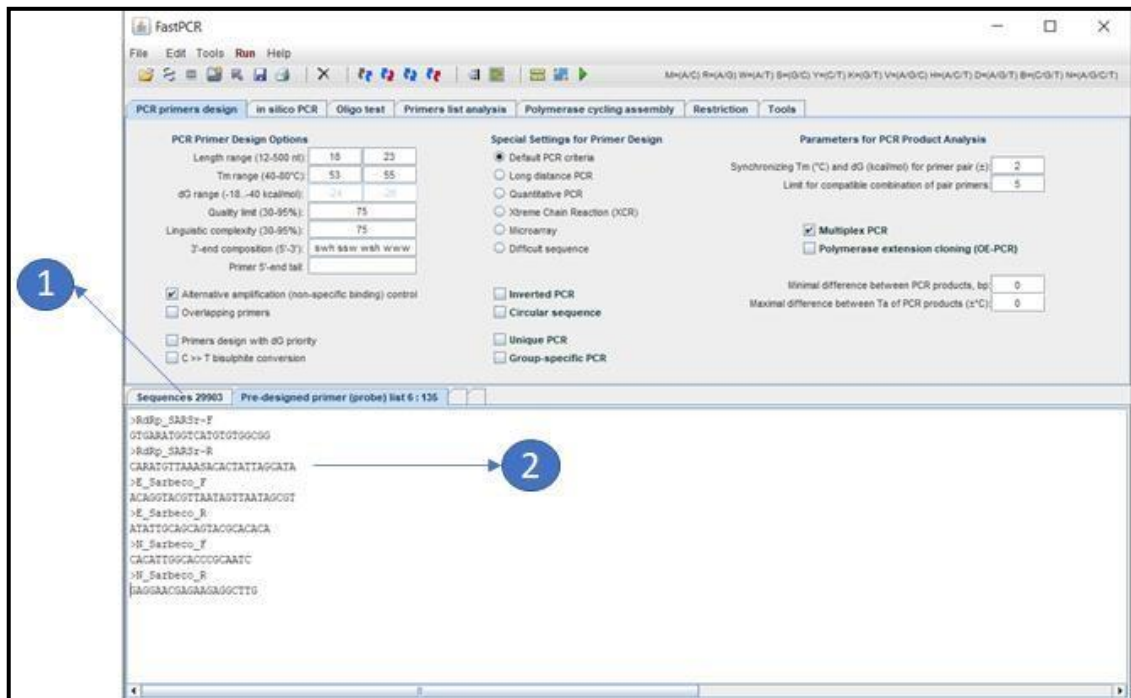


Gambar 7. Proses input file FASTA ke dalam perintah *in silico PCR* di FastPCR

- Setelah file “*Sample 1.txt*” berhasil maka selanjutnya dapat dimasukkan tiga (3) primer berikut yang menjadi target untuk deteksi SARS-COV-2 (Tabel 1.). Urutan tahapan dan tampilan seperti Gambar 7.

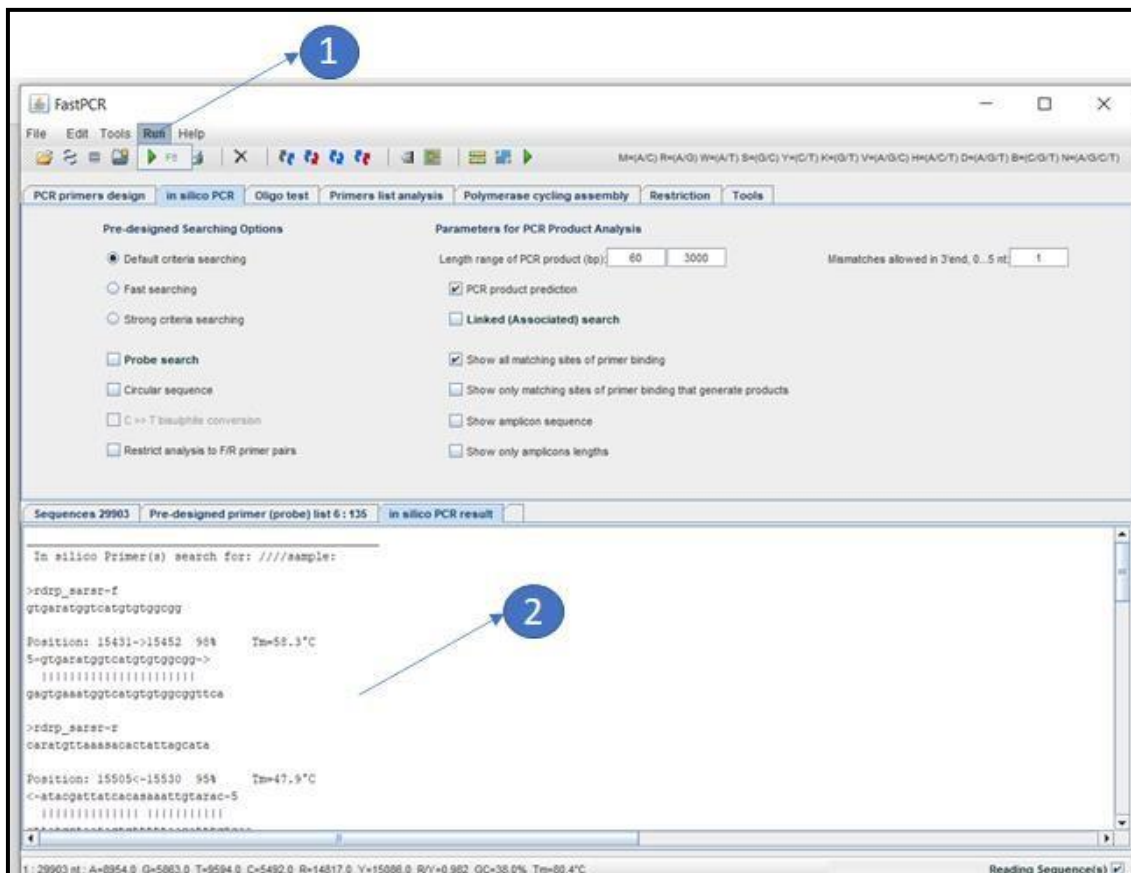
Tabel 1. Primer untuk amplifikasi gen RdRp, E, dan N SARS-COV-2 (Corman et al. 2020)

Nama Primer	Urutan Primer (5'-3')	Gen Target
RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	RdRP gene
RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	E gene
E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	N gene
N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	



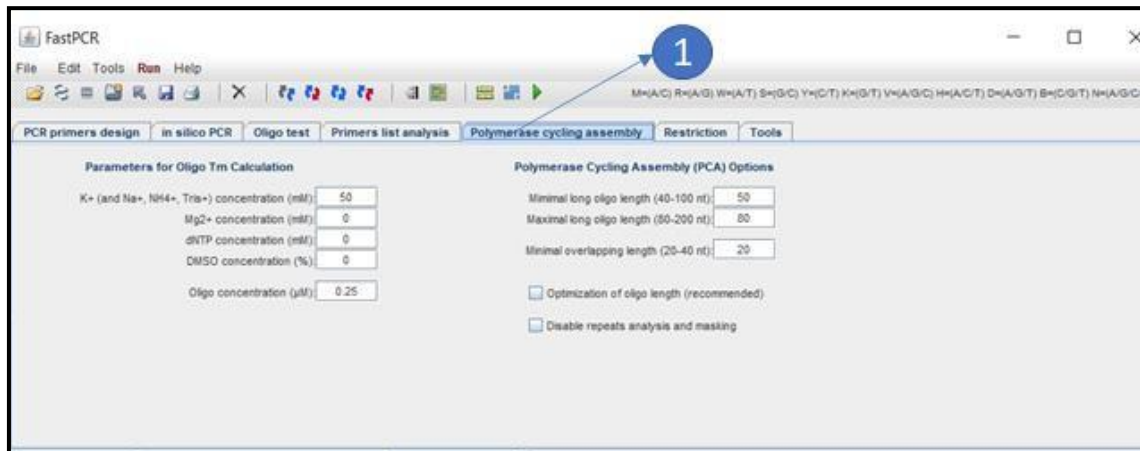
Gambar 7. Input file “*Sample 1.txt*” dan urutan primer di FastPCR

4. Program in silico PCR dijalankan dengan menekan perintah Run atau F5 pada computer, beberapa saat kemudian akan muncul hasil prediksi penempelan primer dan produk PCR. Perhatikan nilai persentase dan produk amplikonnya seperti pada Gambar 8.



Gambar 8. Perintah menjalankan in silico PCR dan outputnya

5. Simulasi *in silico* dapat dilakukan dengan menambahkan komponen reagen PCR seperti konsentrasi primer, buffer, dan kofaktor yang akan berpengaruh pada rekomendasi suhu luruh (T_m) dan suhu penempelan (T_a) primer (Gambar 9.)



Gambar 9. Pengaturan simulasi pengaruh konsentrasi primer, buffer, dan kofaktor terhadap suhu luruh (T_m) dan suhu penempelan primer (T_a).

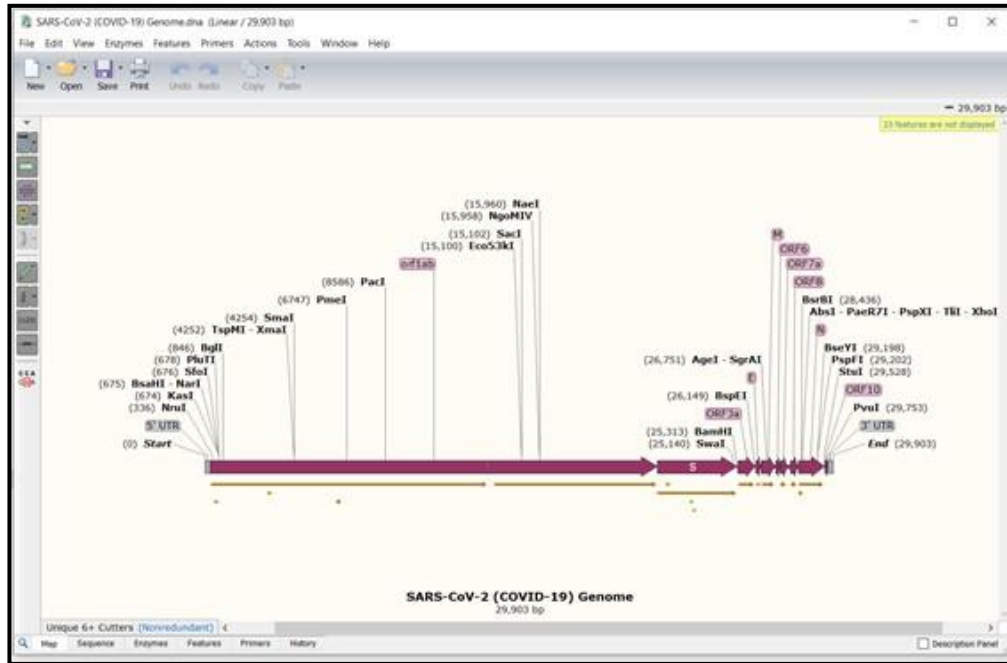
Simulasi Elektroforesis Gel Agarosa di Snapgene

1. Perangkat lunak Snapgene dapat diunduh di laman <https://www.snapgene.com/>
2. Instalasi mengikuti petunjuk yang ada di laman di atas. Jika proses instalasi berhasil akan muncul tampilan antarmuka seperti Gambar 10.



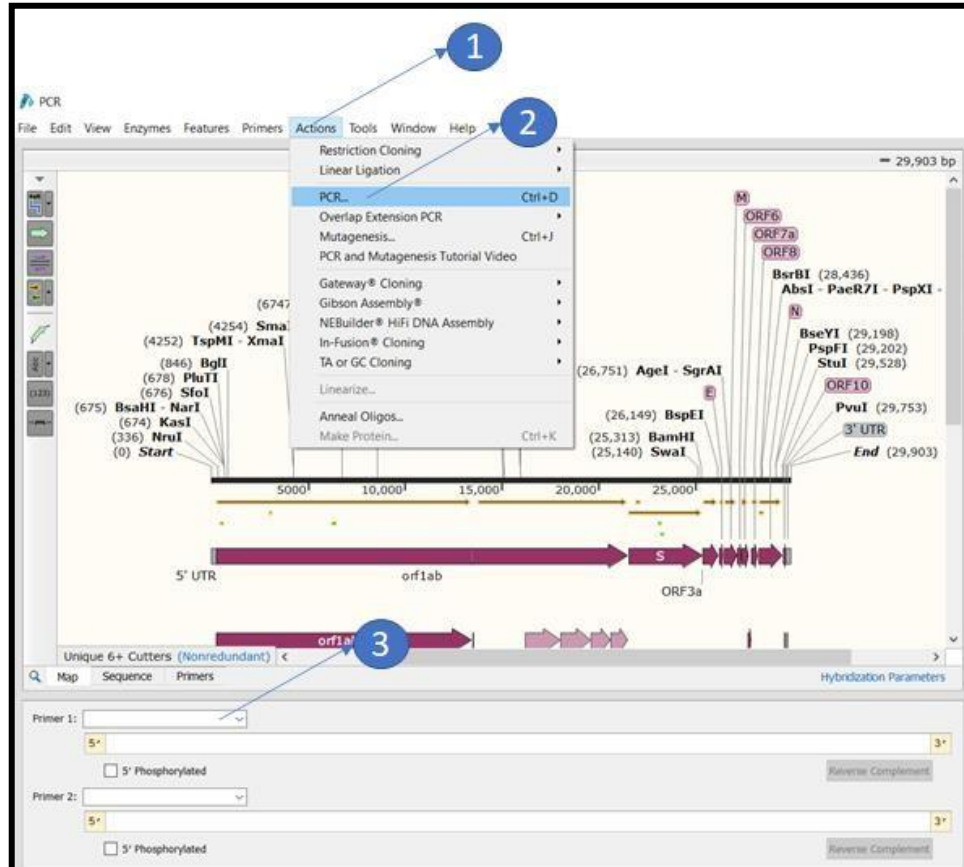
Gambar 10. Tampilan antarmuka perangkat lunak Snapgene.

3. Simulasi elektroforesis gel agarosa dapat dibuka dengan menekan “*Open*” kemudian pilih file contoh yang diberikan dengan nama file “*SARS-CoV-2 (COVID-19) Genome*” sehingga akan muncul tampilan seperti Gambar 11. berikut.



Gambar 11. Tampilan file “SARS-CoV-2 (COVID-19) Genome” di perangkat lunak Snapgene.

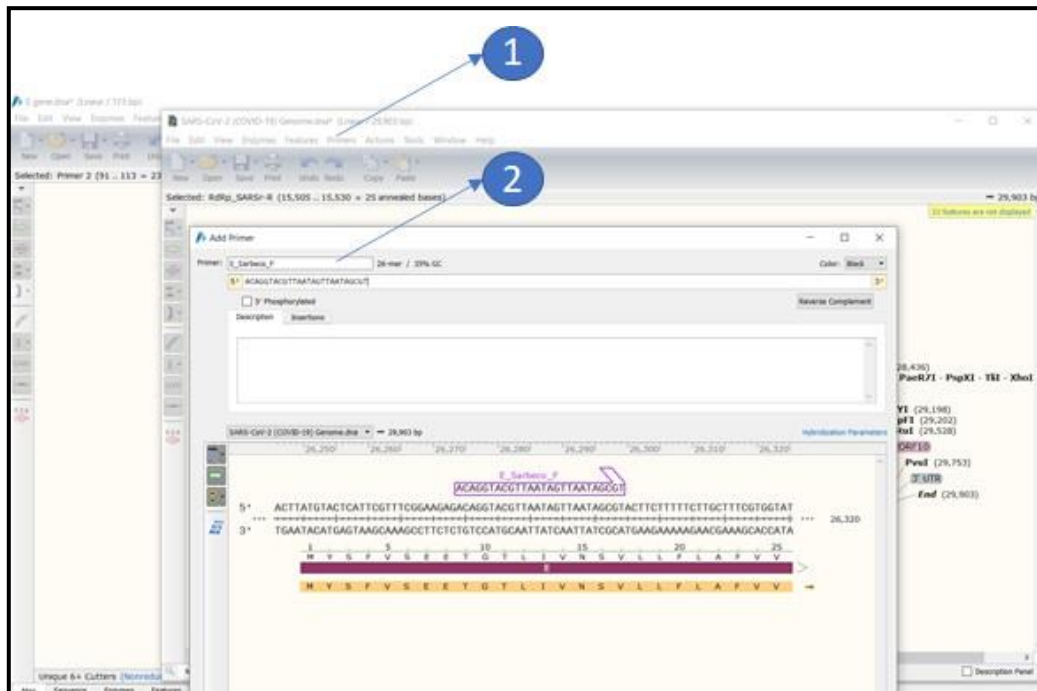
- Perangkat lunak Snapgene juga dapat melakukan in silico PCR yaitu dengan memilih bagian “Action” lalu “PCR” setelah akan muncul pilihan untuk memasukkan primer seperti pada Gambar 12 berikut.



Gambar 12. Tahapan melakukan in silico PCR di perangkat lunak Sanpgene

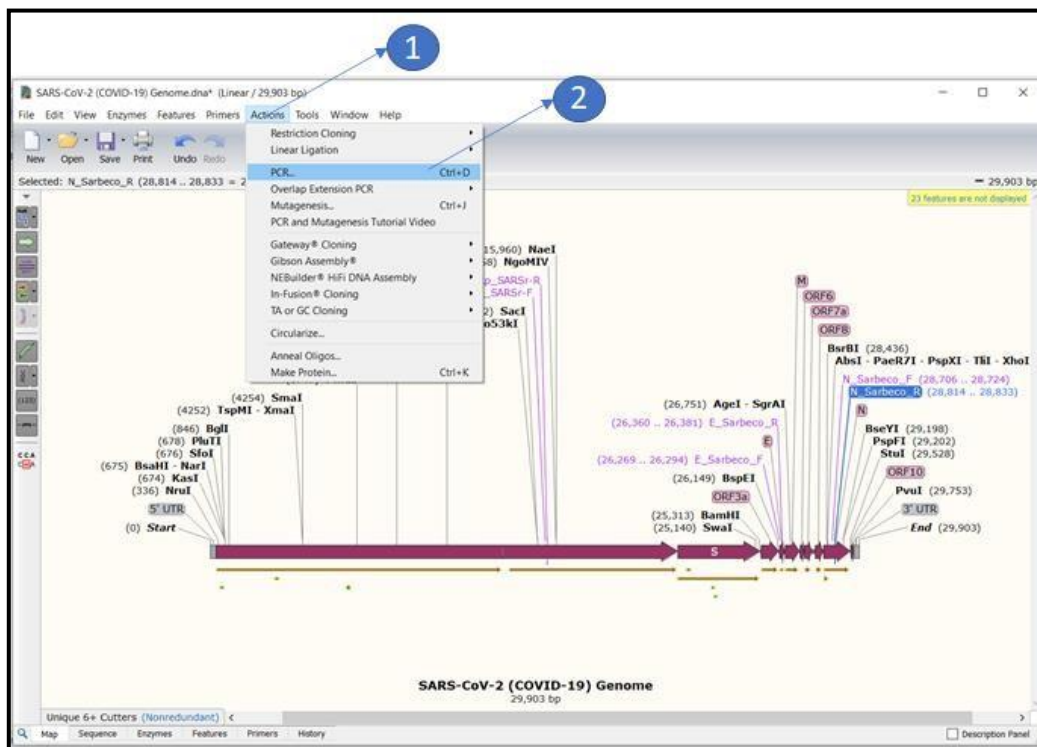
Modul Praktikum Biologi Molekuler: PCR dan Elektroforesis Gel Agarosa

5. Simulasi PCR menggunakan urutan primer pada Tabel 1. diatas dan memasukkan satu per satu primer dengan memilih bagian “*Primer*” kemudian “*Add Primer*” seperti pada Gambar 13.



Gambar 13. Tahapan memasukkan urutan primer di Snapgene

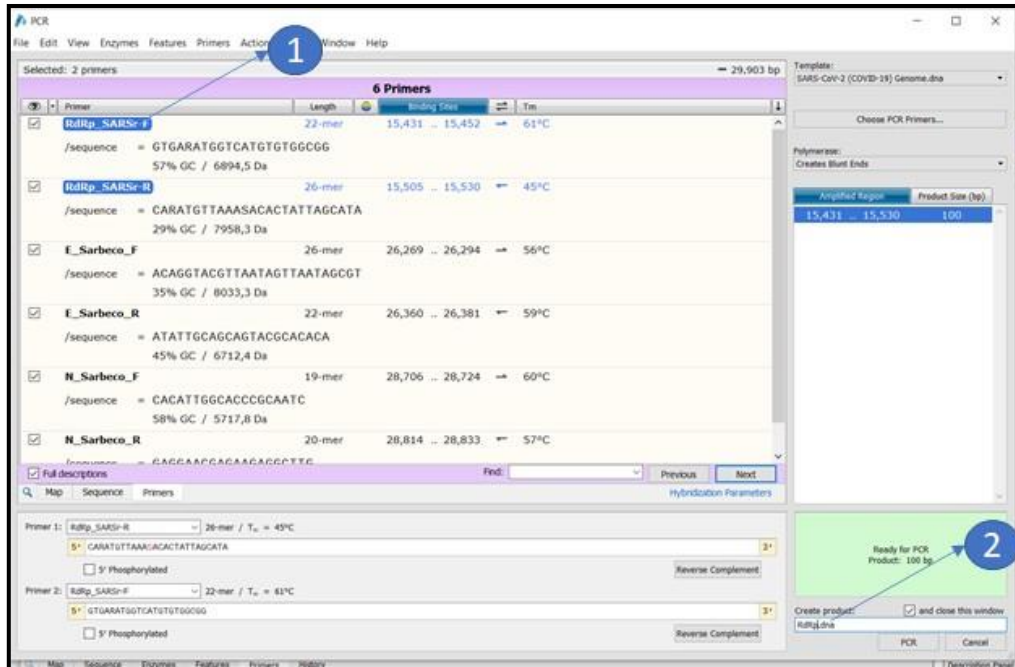
6. Simulasi PCR dengan tiga (3) gen target di atas dapat dilakukan dengan menekan “*Action*” kemudian “*PCR*” seperti Gambar 14.



Gambar 14. Proses untuk memulai simulasi PCR.

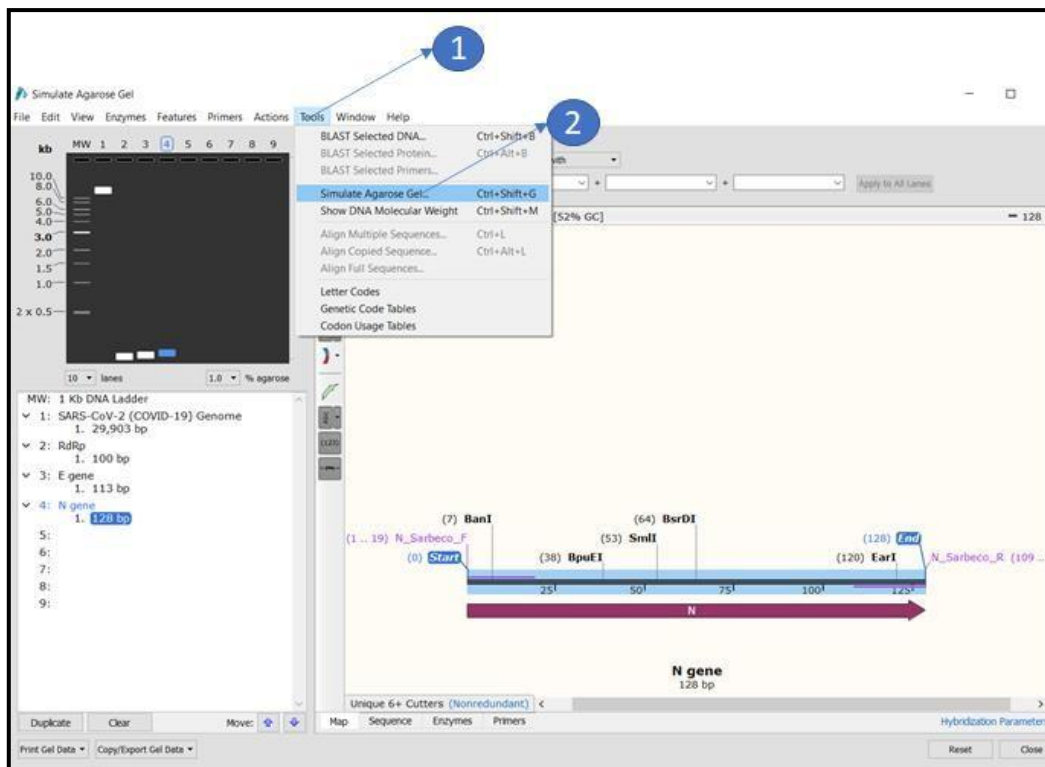
Modul Praktikum Biologi Molekuler: PCR dan Elektroforesis Gel Agarosa

7. Gen yang akan diamplifikasi dan divisualisasikan dilihat pada bagian “Primer” kemudian pilih primer untuk tiap produk. Ulangi tahapan sesuai dengan jumlah gen dan mengganti nama product sesuai dengan gen pada bagian “Create product” seperti pada Gambar 15.



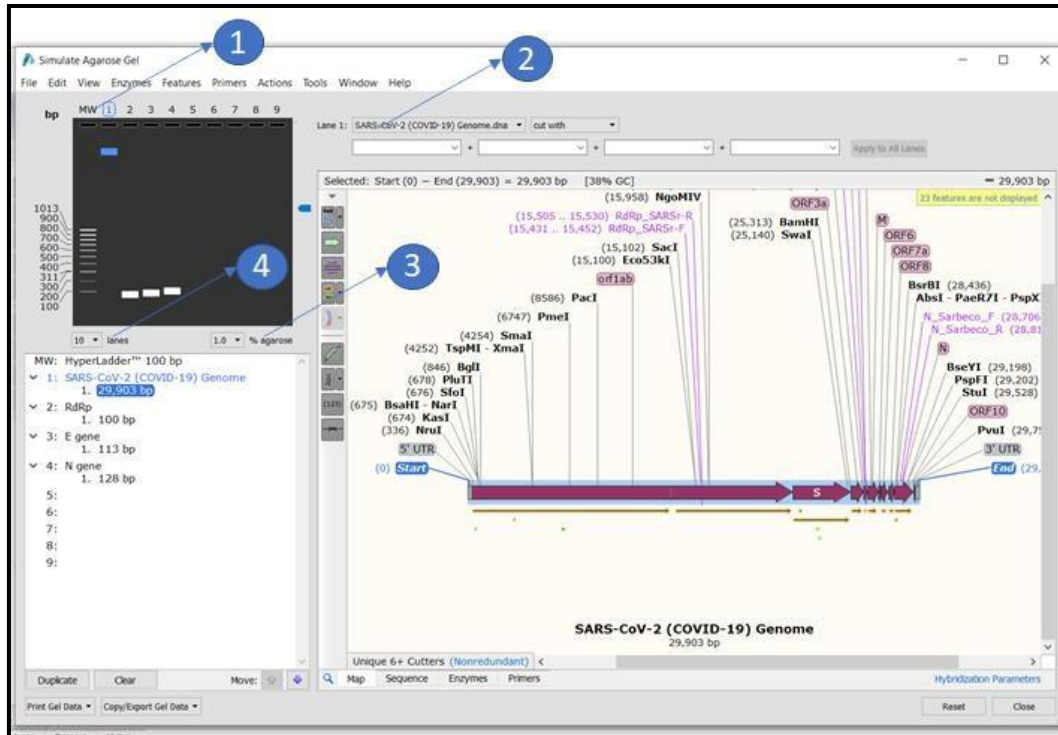
Gambar 15. Simulasi PCR tiap gen target.

8. Simulasi hasil produk PCR dari tiga gen target dapat dilakukan dengan menekan bagian “Tools” kemudian pilih “Simulate Agarose Gel” Seperti Gambar 16.



Gambar 16. Simulasi elektroforesis gel agarosa produk PCR tiap gen target.

9. Tampilan simulasi elektroforesis gel agarose dapat diubah dengan memilih bagian “MW” untuk *DNA ladder*, bagian “lane” untuk pita DNA, bagian “% agarose” untuk konsentrasi gel, dan bagian “lanes” untuk jumlah baris sampel gel seperti terlihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Tahapan pengaturan parameter untuk simulasi elektroforesis gel agarosa di perangkat lunak Snapgene.

Daftar Acuan

- Corman V.M, Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W, Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G.J.C, Haagmans B.L, van der Veer B., van den Brink ., Wijsman L., Goderski G., Romette J.-L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans Marion P.G., Drosten C.. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- Edel V. 2008. Polymerase chain reaction in mycology: An overview. Dalam. P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy, and R.P. Elander (eds.), *Applications of PCR in Mycology* (pp. 1-20). CAB International, Oxford, UK.
- Haris E. 1998. A low-cost approach to PCR: Appropriate transfer of biomolecular techniques. Oxford: Oxford University Press.
- Holtzhauer M. 2006. Basic methods for the biochemical lab. Springer: Berlin, Germany.
- Kalendar R., Muterko A., Shamekova M., and Zhambakin K. 2017. In Silico PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. Dalam. L. Domingues (ed.), *PCR: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1620* (pp.1-32). Humana Press, New York, USA.
- Kasibhatla S.M., Kinikar M., Limaye S., Kale M.M., and Kulkarni-Kale U. 2020. Understanding evolution of SARS-CoV-2: A perspective from analysis of genetic diversity of RdRp gene. *J Med Virol*. 92:1932–1937.
- Katoch R. 2011. Analytical techniques in biochemistry and molecular biology. Springer: Palampur, HP, India.

- Lan V.T.T., Loan P.T.T., Duong P.A.T., Thanh L.T., Ha N.T., and Thuan T.B. 2012. Straightforward procedure for laboratory production of DNA ladder. *Journal of Nucleic Acids*, 254630, doi:10.1155/2012/254630.
- Lorenz T.C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.*, (63), e3998, doi:10.3791/3998
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12): e63.
- Pelt-Verkuil E.V., Belkum A.V., and Hays J.P. 2008. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Dordrecht: Springer.
- Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Dahlenborg M., and Löfström C. 2003. Pre-PCR Processing of Samples. Dalam. K. Sachse and J. Frey (Eds.), *Methods in Molecular Biology, vol. 216: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols*. (pp. 31-50). Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
- Walker-Daniels J. 2012. Current PCR methods. *Mat Methods* 2:119. doi:10.13070/mm.en.2.119.

Lembar Kerja Praktikum Biologi Molekuler: PCR dan Elektroforesis Gel Agarosa

Petunjuk Pengisian:

- Lembar kerja dikerjakan tiap individu mahasiswa dan dikumpulkan dalam bentuk *hardcopy* dengan mencantumkan nama, NPM, dan kelompok.
- Jawaban tahapan kerja merupakan hasil dari kelompok masing-masing.
- Pembahasan harus menggunakan sumber referensi menggunakan daftar acuan dengan tahun 2000 untuk referensi tertua.

Nama :

NPM :

Kelompok :

1. Berdasarkan simulasi menggunakan data dari file “*Sample 1.txt*” dan “*SARS-CoV-2 (COVID-19) Genome*” di FastPCR dan Snappene, rekomendasi target manakah yang kalian gunakan sebagai produk target (amplicon)!

2. Jika kalian akan melakukan PCR dengan menggunakan tiga (3) tipe master mix dari NEB, yaitu OneTaq® 2X Master Mix with GC Buffer, Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, dan Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer dengan komposisi seperti pada Tabel 1. berikut. Sebutkan berapa rekomendasi Tm dan Ta dari FastPCR dari ketiga produk tersebut dan jelaskan mengapa dapat muncul perbedaan nilai tersebut!

Tabel 1. Perbandingan konsentrasi komponen mastermix yang digunakan dalam simulasi

Komponen Mastermix	OneTaq® 2X Master Mix with GC Buffer	Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer
Bufur (K ⁺ , Na ⁺ , NH ⁴⁺ , Tris ⁺) (mM)	20	20	50
Mg ²⁺ (mM)	2	2	2
dNTP (mM)	0,2	0,2	0,2
DMSO/Enhancer (%)	10	0	3
Primer (μM)	0,2	0,5	0,5

3. Jelaskan pengaruh DMSO/enhancer dalam reaksi PCR!

4. Jelaskan marka gen apa yang dapat digunakan sebagai penanda spesifik bagi SARS-COV-2!

Daftar Acuan

- Ahmed W., Bertsch P.M., Bivins A., Bibby K., Farkas K., Gathercole A., Haramoto E., Gyawali P., Korajkic A., McMinng B.R., Mueller J.F., Simpson S.L., Smith W.J.M., Symonds E.M., Thomas K.V., Verhagen R., and Kitajima M. 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of the Total Environment*, 739: 139960. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>
- Corman V.M, Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W, Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G.J.C, Haagmans B.L, van der Veer B., van den Brink ., Wijsman L., Goderski G., Romette J.-L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans Marion P.G., Drosten C.. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 25(3);pii=2000045. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.