

PRINSIP DASAR *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) UNTUK DETEKSI PATOGEN PADA TANAMAN SECARA MOLEKULER

Miftakhurohmah

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalann Tentara Pelajar No. 3 Bogor, 16111
Email: miftah.tia05@balittro@telkom.net

Deteksi patogen perlu dilakukan sebelum diputuskan tindakan yang akan dilakukan. Teknik PCR akhir-akhir ini banyak menjadi pilihan untuk deteksi patogen karena hasilnya lebih cepat dan akurat, terutama untuk virus tanaman. Hal yang perlu dipelajari adalah protokol teknik isolasi DNA atau RNA, pemilihan primer, dan pereaksi PCR serta protokol penggunaannya agar diperoleh hasil yang optimal.

Kata kunci : deteksi, patogen, PCR

PENDAHULUAN

Deteksi patogen yang akurat pada tanaman terserang penyakit menjadi persyaratan penting sebelum dilakukan tindakan pengendalian. Teknik deteksi patogen berdasarkan morfologi, hanya dapat dilakukan untuk jenis-jenis patogen yang berukuran mikroskopis, yaitu cendawan, nematoda, dan bakteri dan teknik ini memerlukan waktu yang lama. Untuk mendapatkan informasi jenis patogen secara lebih cepat dan akurat dapat dilakukan secara molekuler, di antaranya dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

PCR merupakan teknik yang memungkinkan memperbanyak DNA dari patogen target. DNA atau RNA dapat diperoleh dari sampel tanaman (untuk virus) maupun sampel jaringan patogen (untuk bakteri, jamur, dan nematoda). Proses PCR terdiri atas tiga tahap : denaturasi, *annealing*, dan ekstensi.

Denaturasi merupakan proses pemisahan DNA utas ganda yang umumnya memerlukan suhu yang tinggi, yaitu 92–95° C. Setelah DNA terpisah, dilanjutkan dengan tahap *annealing*, yaitu penempelan primer pada DNA utas tunggal yang berfungsi sebagai awalan dalam

proses pencetakan pasangan DNA tersebut. Suhu yang diperlukan pada tahap *annealing* tergantung primer yang digunakan, berkisar antara 35–60 °C. Setelah penempelan primer, dilanjutkan dengan tahap ekstensi, yaitu pemanjangan DNA sehingga menjadi utas ganda. Ketiga tahap tersebut diulang berkali-kali, yang sering dinamakan dengan siklus dan proses PCR umumnya terdiri atas 20–40 siklus.

Karena proses PCR terdiri atas beberapa suhu yang diulang-ulang, pada prinsipnya teknik ini memerlukan alat yang dapat diatur perubahan suhunya. Pada awal pelaksanaan PCR digunakan tiga penangas air yang telah diatur suhunya sesuai dengan suhu denaturasi, *annealing*, dan ekstensi. Tabung PCR dipindahkan dari satu penangas ke penangas yang lain berkali-kali, sesuai siklusnya. Seiring dengan perkembangan zaman, saat ini kegiatan PCR dapat dilakukan pada mesin yang dapat diatur sesuai suhu dan siklus yang diperlukan sehingga sangat memudahkan pelaksanaannya.

Hal-hal penting yang mempengaruhi keberhasilan deteksi patogen dengan teknik PCR adalah teknik isolasi DNA (atau RNA untuk virus) serta pemilihan primer dan pereaksi PCR yang tepat. Sedangkan untuk mengecek hasil PCR dilakukan dengan memvisualisasikannya pada gel elektroforesis. Tulisan ini menguraikan tentang isolasi DNA dan RNA, cara memilih primer, dan pereaksi PCR yang tepat dan visualisasi hasil PCR.

ISOLASI DNA DAN RNA

Templat DNA berfungsi sebagai cetakan awal pada proses PCR untuk membentuk DNA baru yang sama dengan DNA templatnya. Untuk patogen (umumnya virus) yang memiliki asam nukleat RNA; sebelum

PCR, dilakukan perubahan dulu dari RNA menjadi cDNA (*complementary DNA*) dengan proses RT-PCR (*reverse transcriptase-PCR*).

Beberapa teknik isolasi DNA dan RNA telah tersedia dan sudah banyak dipublikasikan. Pada prinsipnya, ada 2 teknik isolasi (1) menggunakan bufer-bufer yang dapat dibuat sendiri; (2) menggunakan kit yang tersedia secara komersial. Pada dasarnya kedua macam teknik ini dapat menghasilkan DNA atau RNA yang diperlukan asalkan dilakukan sesuai protokolnya. Bila menggunakan bufer yang dibuat sendiri maka akan meminimalkan biaya yang dikeluarkan, namun diperlukan pengerjaan yang lebih lama dan ketelitian yang lebih tinggi, dari mulai pembuatan bufer hingga proses pengerjaannya. Sebaliknya, bila menggunakan kit komersial, pengerjaannya lebih singkat dan sederhana, namun diperlukan biaya yang lebih tinggi.

Keberhasilan isolasi DNA atau RNA merupakan langkah awal keberhasilan deteksi patogen dengan PCR. Oleh karena itu, sebelum melakukan kegiatan ini, perlu mempelajari protokolnya dengan seksama. Pengecekan kualitas DNA atau RNA hasil isolasi dapat dilakukan dengan elektroforesis. Hasil DNA murni akan terlihat sebagai pita DNA utuh di bagian atas gel, sedangkan RNA akan terlihat dua pita dan *smear* (pola pita yang seperti bayangan) (Gambar 1).

Selain pengecekan kualitas dengan elektroforesis, dapat juga dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Rasio OD 260 dan OD 280 dapat menunjukkan kemurnian DNA/RNA dan konsentrasi totalnya (berat DNA yang dihasilkan). Konsentrasi DNA yang digunakan sebagai cetakan awal pada proses PCR akan mempengaruhi hasilnya. Bila terlalu tinggi, akan menghambat proses amplifikasi

(pembentukan DNA baru). Berat DNA optimal untuk proses PCR berkisar antara 30-500 ng (nanogram). Bila DNA hasil isolasi memiliki konsentrasi yang terlalu tinggi, perlu dilakukan pengenceran supaya mendapatkan hasil PCR yang maksimal. Namun, untuk deteksi patogen, informasi tentang konsentrasi total DNA/RNA tidak diperlukan karena DNA/RNA patogen merupakan bagian dari DNA/RNA total tersebut. Pengecekan kualitas RNA atau DNA untuk deteksi patogen cukup dilakukan dengan gel elektroforesis. Sedangkan pengecekan kuantitas DNA/RNA dengan spektrofotometer umumnya diperlukan untuk kegiatan molekuler dengan target tanaman.

PEMILIHAN PRIMER

Untuk deteksi patogen yang telah dipublikasi maka penggunaan primer dapat mengacu pada publikasi yang sudah ada. Sebagai contoh, deteksi *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2) pada nilam di Indonesia menggunakan primer yang digunakan untuk mendeteksi BBWV2 pada tanaman *chinese yam* (sejenis tanaman umbi-umbian) di Jepang dan mendapatkan hasil sesuai yang diharapkan. Bila sudah mendapatkan urutan nukleotida primer yang diperlukan, primer dapat dipesan pada perusahaan komersial. Di Indonesia ada beberapa perusahaan-perusahaan komersial yang menyediakan pemesanan primer. Waktu pemesanan sampai primer tersedia sekitar dua minggu.

Sebelum primer digunakan, kita harus mempelajari protokol penggunaannya, yang selalu disertakan bersama primer yang kita terima dari

perusahaan komersial. Hal yang penting diperhatikan adalah (1) Sebelum tutup botol primer dibuka, botol primer perlu disentrifugasi terlebih dahulu karena ada kemungkinan beberapa produknya menempel di bagian tutup botol selama pengiriman; (2) Volume pengencer yang diperlukan untuk setiap primer karena akan menentukan konsentrasinya. Umumnya stok primer disimpan pada konsentrasi 100 μ M (mikro molar) dan jumlah pengencer yang diperlukan sudah dijelaskan pada protokol yang disertakan; (3) Suhu yang diperlukan pada kegiatan PCR (tahap *annealing*). Pada publikasi, umumnya sudah disertakan program PCR-nya sehingga kita dapat menggunakan suhu *annealing* sesuai dengan yang tertulis dipublikasi. Namun demikian, terkadang tidak sesuai untuk target kita dan masih diperlukan beberapa optimasi.

PEREAKSI PCR

Pereaksi PCR yang diperlukan adalah enzim polymerase DNA, bufer PCR, dNTP, dan $MgCl_2$ yang dapat diperoleh dengan memesan pada perusahaan komersial. Terdapat banyak pilihan produk pereaksi PCR. Karena harganya tinggi, sebelum menentukan produk pereaksi PCR yang akan digunakan, sebaiknya meminta sampel kepada perusahaan yang bersangkutan untuk dicoba terlebih dahulu. Terkadang, produk untuk target tertentu, tidak cocok untuk kegiatan PCR target kita.

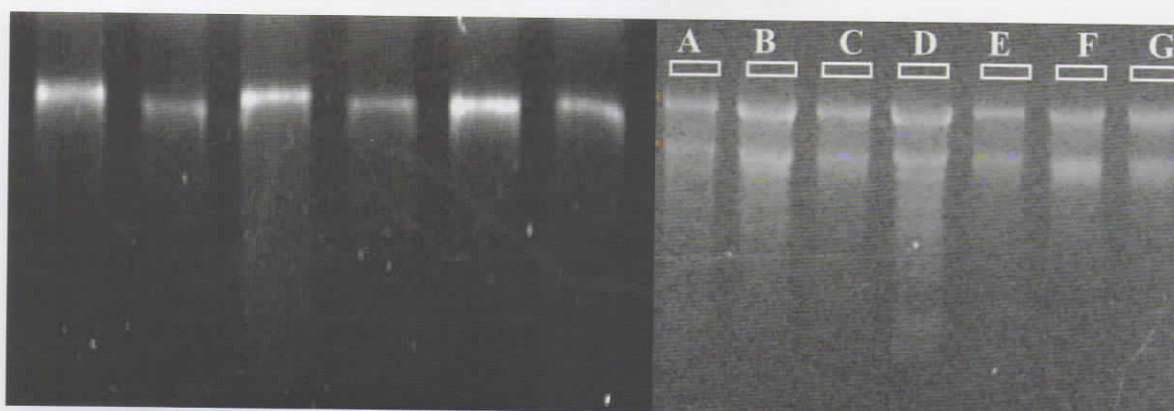
Enzim polymerase DNA berfungsi sebagai katalisis pada pembentukan rantai DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Enzim ini

diperoleh dari bakteri *Thermus aquaticus* yang tahan terhadap pemanasan yang tinggi (Yusuf, 2010). Pemilihan enzim yang tepat termasuk salah satu kunci keberhasilan teknik PCR. Sebelum menggunakan enzim DNA polymerase, perlu membaca dengan detail petunjuknya, terutama suhu dan waktu denaturasi. Tiap-tiap produk enzim DNA polymerase, memiliki suhu denaturasi yang berbeda. Misalnya, produk enzim DNA polymerase perusahaan A memerlukan suhu denaturasi 94°C, sedangkan produk perusahaan B memerlukan suhu denaturasi 95°C.

Pemilihan suhu denaturasi ini termasuk hal yang menentukan dalam kegiatan PCR. Bila primer yang kita gunakan mengacu pada suatu publikasi, umumnya sudah dilengkapi dengan program PCR-nya. Namun, terkadang dengan suhu denaturasi yang sesuai publikasi, hasilnya tidak sesuai yang diharapkan, karena enzim DNA polymerase yang digunakan berbeda.

Selain suhu denaturasi, hal lain yang perlu diperhatikan adalah jumlah enzim yang diperlukan dalam 1 reaksi PCR, yang ditentukan oleh ukuran target DNA. Jumlah enzim yang diperlukan sesuai ukuran target DNA umumnya juga dijelaskan pada buku panduan penggunaannya.

Bufer PCR diperlukan untuk menjaga kondisi pH pereaksi PCR karena kegiatan PCR memerlukan kondisi pH tertentu (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Bufer PCR sebaiknya berasal dari produk yang sama dengan enzim DNA polymerase. Pada umumnya enzim DNA polymerase dijual menyatu dengan bufer PCR.



Gambar 1. Hasil visualisasi RT-PCR dengan primer BBWVSSP dan BBWVKMRM pada gel agarosa 1.5%, M. Penanda DNA 100 pb, K. kontrol negatif, 1-2. isolat dari Manoko positif, 3. isolat Manoko negatif, 4-6. isolat dari Cicurug positif, 7-9. isolat dari Cijeruk positif (Miftakhurohmah et al., 2013)

Fungsi dari $MgCl_2$ adalah untuk menstimulasi aktivitas enzim DNA polimerase. Dalam proses PCR, konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh pada hasil PCR yang dapat dilihat saat visualisasi. Kekurangan $MgCl_2$ akan menyebabkan terjadinya penurunan kualitas produk PCR, sedangkan bila kelebihan akan terbentuk beberapa pita DNA non-target. Setiap target DNA memerlukan konsentrasi $MgCl_2$ tertentu, umumnya berkisar antara 1,0–1,5 mM (milimolar) (Handoyo dan Rudiretna, 2000; Pharmawati, 2009). Bila kegiatan PCR kita sudah mengacu pada suatu publikasi, umumnya konsentrasi masing-masing pereaksi PCR sudah disebutkan sehingga kita tinggal mengacu pada publikasi tersebut.

Beberapa bufer PCR umumnya sudah mengandung $MgCl_2$ pada konsentrasi tertentu. Bila kandungan $MgCl_2$ pada bufer PCR yang digunakan sudah sesuai keperluan DNA target, tidak diperlukan penambahan $MgCl_2$, demikian sebaliknya. Sebagai contoh, untuk deteksi *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) pada sampel daun lada dengan primer PYMoV-F dan PYMoV-R memerlukan $MgCl_2$ 1,0 mM dan bufer PCR yang digunakan mengandung $MgCl_2$ 1,0 mM sehingga tidak diperlukan lagi penambahan $MgCl_2$.

dNTP merupakan campuran dari dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat), dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat), yang berfungsi sebagai penyedia nukleotida untuk sintesis DNA dalam proses PCR (Yusuf, 2010). Konsentrasi dNTP

dalam proses PCR harus ditentukan, dapat mengacu pada publikasi atau buku panduan penggunaan enzim DNA polimerase yang kita beli. Pada umumnya konsentrasi dNTP pada reaksi PCR berkisar antara 200–250 μM . Perubahan konsentrasi dNTP akan berpengaruh pada ketersediaan ion Mg^{++} yang berasal dari $MgCl_2$. Kelebihan konsentrasi dNTP akan menyebabkan terjadinya ikatan dNTP dengan Mg^{++} sehingga akan mengurangi ketersediaan ion tersebut dalam reaksi PCR.

VISUALISASI HASIL PCR

Untuk mengecek hasil kegiatan deteksi patogen dengan PCR yang kita lakukan, produk PCR divisualisasikan pada gel agarose seperti halnya pengecekan kualitas DNA. Penggunaan primer pada deteksi patogen secara PCR hanya akan mengamplifikasi bagian tertentu dari genom patogen dengan ukuran tertentu. Untuk mengecek kebenaran ukuran pita DNA target, digunakan penanda DNA yang tersedia secara komersial. Sebagai contoh, deteksi BBWV2 pada tanaman nilam, menggunakan primer BBWVSSP dan BBWVKMRM dengan target bagian dari gen *coat protein* (CP) BBWV2 yang berukuran 323 pasang basa (pb). Hasil ini menunjukkan bahwa sampel no 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 positif terinfeksi BBWV2 (Gambar 2).

PENUTUP

Pemilihan primer serta penentuan suhu *annealing* yang tepat sangat menentukan keberhasilan pembentukan DNA baru. Sedangkan

pemilihan pereaksi PCR yang meliputi enzim DNA polimerase dan bufer PCR, penentuan konsentrasi $MgCl_2$ dan dNTP serta penentuan suhu denaturasi yang tepat akan mendapatkan produk PCR yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Amanda, U. D. dan Cartealy, I.C. 2015. Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. Var. Tenera). Pros. Semnas Masy. Biodiv. Indonesia 1 (2) : 171–176.
- Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2000. Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). Unitas. 9 (1) : 17–29.
- Miftakhurohmah, G. Suastika, dan T.A. Damayanti. 2013. Deteksi serologi dan molekuler beberapa jenis virus yang berasosiasi dengan penyakit mosaik pada tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth). Jurnal Littri 19 (3): 130–138.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea spp.* (Proteaceae). Jurnal Biologi 13 (1): 12–16.
- Syafaruddin dan T.J. Santoso. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). Jurnal Littri 17 (1) : 11–17.
- Yusuf, Z.K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). Saintek. 5 (6). 6 hlm.



Gambar 2. Hasil visualisasi RT-PCR dengan primer BBWVSSP dan BBWVKMRM pada gel agarosa 1,5%. M. Penanda DNA 100 pb, K. kontrol negatif, 1-2. isolat dari Manoko positif, 3. isolat Manoko negatif, 4-6. isolat dari Cicurug positif, 7-9. isolat dari Cijeruk positif (Miftakhurohmah *et al.*, 2013).