



UNIVERSITAS  
KRISTEN  
MARANATHA

Fakultas  
Kedokteran

# PENELITIAN BIOMEDIK DAN ILMU KEDOKTERAN

PENELITIAN BIOMEDIK DAN ILMU KEDOKTERAN



**EDITOR :**  
**Meilinah Hidayat**  
**Cindra Paskaria**  
**Decky Gunawan**



# **PENELITIAN BIOMEDIK DAN ILMU KEDOKTERAN**

PENULIS:

Dr. Meilinah Hidayat, dr., M.Kes., dkk

EDITOR:

Dr. Meilinah Hidayat, dr., M.Kes.

Cindra Paskaria, dr., MKM.

Decky Gunawan, dr., M.Kes., AIFO.



**PENERBIT ALFABETA BANDUNG**

UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA  
NOMOR 28 TAHUN 2014 TENTANG HAK CIPTA

**Pasal 9**

- (1) Pencipta atau pemegang Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 8 memiliki Hak Ekonomi untuk melakukan:
  - a. Penerbitan Ciptaan;
  - b. Penggandaan Ciptaan dalam segala bentuknya;
  - e. Pendistribusian Ciptaan atau salinannya;
  - g. Pengumuman Ciptaan;
- (2) Setiap orang yang melaksanakan hak ekonomi sebagaimana dimaksud pada ayat (1) wajib mendapatkan izin Pencipta atau Pemegang Hak Cipta.
- (3) Setiap Orang yang tanpa izin Pencipta atau Pemegang Hak Cipta dilarang melakukan penggandaan dan/atau Penggunaan Secara Komersial Ciptaan.

**Pasal 113**

- (3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- (4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

**Hak Cipta Dilindungi Undang-undang**

Dilarang keras memperbanyak, memfotokopi sebagian atau seluruh isi buku ini, serta memperjualbelikannya tanpa mendapat izin tertulis dari Penerbit.

© 2020, Penerbit Alfabeta, Bandung

Pnlt29 (vii + 180) 18 x 25 cm

Judul Buku : Penelitian Biomedik dan Ilmu Kedokteran

Editor : Dr. Meilinah Hidayat, dr., M.Kes.  
Cindra Paskaria, dr., MKM.  
Decky Gunawan, dr., M.Kes., AIFO.

Penerbit : ALFABETA, cv  
Jl. Gegerkalong Hilir No. 84 Bandung  
Telp. (022) 200 8822 Fax. (022) 2020 373  
Mobile/Message: 081 1213 9484  
Website: www.cvalfabeta.com  
Email: alfabetabdg@yahoo.co.id

Cetakan Kesatu : 2020

ISBN : 978-602-289-640-1

Anggota Ikatan Penerbit Indonesia (IKAPI)

## KATA SAMBUTAN

Puji syukur kepada Tuhan, atas terselesaikannya buku Penelitian Biomedik dan Ilmu Kedokteran. Saya mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah bekerja keras untuk menyusun buku ini, baik semua para penulis, dan para editor buku ini, maupun pihak-pihak lain yang telah berkontribusi dalam penyusunan buku ini.

Sebagai institusi pendidikan, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha harus selalu memperbaharui materi pembelajaran sesuai standar yang berlaku. Karya tulis ilmiah menjadi syarat penting kelulusan seorang sarjana kedokteran. Untuk mempersiapkan dan menyusun karya tulis ilmiah yang baik, disusunlah buku Penelitian Biomedik dan Ilmu Kedokteran ini. Setiap mahasiswa kedokteran harus mempelajarinya dengan sungguh-sungguh sehingga dapat meneliti, menulis dan menyusun laporan hasil penelitiannya dengan benar sesuai dengan format dan kaidah-kaidah penulisan penelitian ilmiah. Mahasiswa diharapkan dapat menuliskan karya tulis ilmiahnya dengan baik serta memublikasikan hasil tulisannya tersebut untuk menunjang karirnya sebagai seorang dokter di masa mendatang.

Besar harapan saya, buku ini dapat dimanfaatkan sebaik-baiknya oleh segenap penggunanya. Demikianlah kata sambutan saya, selamat belajar, sukses, dan senantiasa diberkati Tuhan.

Bandung, Desember 2020

Dr. Diana Krisanti Jasaputra, dr., M Kes.  
Dekan FK Universitas Kristen Maranatha

## KATA SAMBUTAN

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas diterbitkannya buku penunjang pembelajaran di Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha yang merujuk kepada Kerangka Kualifikasi Nasional Indonesia (KKNI). Dalam penerapan KKNI, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha menggunakan metode pembelajaran *Problem Based Learning* (PBL).

Melalui sistem pembelajaran PBL mahasiswa dituntut aktif, mandiri dan belajar sepanjang hayat. Metode-metode pembelajaran diarahkan untuk memancing keingintahuan, memotivasi mahasiswa untuk belajar secara mandiri, melatih untuk berpikir kritis yang berguna baik pada saat berkuliah maupun ketika mahasiswa sudah terjun di masyarakat sebagai dokter. Pembelajaran ini akan berhasil apabila mahasiswa aktif dalam mencari materi pengetahuan dari berbagai sumber yang dapat dipercaya dan dengan demikian melalui pembelajaran mandiri mahasiswa akan lebih mengingat apa yang telah mereka pelajari dan menguasai keahlian untuk belajar.

Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha menerbitkan panduan belajar berupa buku dengan maksud menjembatani tujuan pembelajaran dengan materi dunia kedokteran yang sangat banyak, dinamis, dan kompleks. Tidak ada buku yang dapat menjelaskan kompleksitas dan pengembangannya hanya seorang pembelajar yang dapat menjawab tantangan ini di masa depan. Isi buku ini hanya mencakup panduan umum dari materi yang harus dipelajari oleh mahasiswa secara individual. Mahasiswa wajib mencari sumber pustaka lain untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan mereka. Melalui buku ini diharapkan mahasiswa dapat lebih terarah dan termotivasi untuk mempelajari lebih dalam lagi berbagai topik baik materi pengetahuan, praktikum, dan ketrampilan klinik.

Akhir kata kami mengucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam pembuatan buku ini.

Bandung, Desember 2020

dr. July Ivone, M.K.K, M.Pd.Ked  
Ketua *Medical Education Unit*

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur kepada Tuhan, atas penyusunan dan penerbitan buku Penelitian Biomedik dan Ilmu Kedokteran. Kami mengucapkan banyak terima kasih kepada Dekanat Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, para kontributor, dan semua pihak yang telah bekerja keras dalam penyusunan dan penerbitan buku ini.

Salah satu syarat kelulusan di Fakultas Kedokteran adalah menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah. Agar dapat menunjang hal tersebut, mahasiswa FK harus memahami berbagai teori dasar penelitian dan penulisan ilmiah. Materi di dalam buku ini diharapkan dapat menunjang hal tersebut. Buku ini terdiri dari beberapa materi mengenai penulisan karya tulis ilmiah, statistika bidang kesehatan, dan teknik laboratorium terkini. Mahasiswa diharapkan dapat mempelajarinya dengan baik agar dapat menunjang penelitian dan penulisan KTI-nya sesuai dengan tujuan penyusunan dan penerbitan buku ini.

Kami memohon maaf apabila masih ada kekurangan dalam penyusunan dan penerbitan buku ini. Besar harapan kami, buku ini dapat dimanfaatkan sebaik-baiknya oleh segenap penggunanya.

Bandung, Desember 2020

Tim Editor

## **DAFTAR KONTRIBUTOR**

Cindra Paskaria, dr., MKM.  
Demes Chornelia Martantiningtyas S.Si.,M.Sc  
Dr. Diana Krisanti Jasaputra, dr., M Kes.  
H. Edwin Setiabudi, dr., SpPD., KKV, FINASIM.  
Dr. Hana Ratnawati, dr., M.Kes.  
Dr. Julia Windi Gunadi, dr., M.Kes.  
Dr. Meilinah Hidayat, dr., M.Kes.  
Penny Setyawati, dr., SpPK, M.Kes.  
Stella Tinia Hasianna, dr, M.Kes, IBCLC.  
Susan Irawati, B.Biomed Sc., M.Biomed Sc.  
Prof. Dr. Susy Tjahjani, dr., M.Kes.

# DAFTAR ISI

JUDUL.....	i
KATA SAMBUTAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR KONTRIBUTOR .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
BAB I USULAN PENELITIAN .....	1
BAB II METODE PENELITIAN .....	11
BAB III UJI KLINIK AN DESAIN UJI KLINIK .....	20
BAB IV ETIK PENELITIAN KESEHATAN .....	26
BAB V PENELITIAN MENGGUNAKAN HEWAN COBA .....	35
BAB VI <i>CRITICAL APPRAISAL</i> .....	45
BAB VII PENULISAN ABSTRAK.....	53
BAB VIII DAFTAR PUSTAKA .....	62
BAB IX STATISTIK DESKRIPTIF.....	71
BAB X STATISTIK INFERENSIAL.....	77
BAB XI BESAR SAMPEL DAN CARA PENGAMBILAN SAMPEL .....	83
BAB XII <i>BASIC CELL CULTURE</i> .....	89
BAB XIII <i>STEM CELL</i> .....	98
BAB XIV <i>IMMUNOASSAY</i> .....	106
BAB XV <i>POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)</i> .....	120
LAMPIRAN.....	141





# **BAB XV**

## ***POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)***

*Demes Chornelia Martantiningtyas*

---

### **Pendahuluan**

Suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan sekuens nukleotida secara eksponensial dengan cara *in vitro* disebut sebagai reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*). *Polymerase chain reaction* (PCR) pertama kali dikembangkan pada tahun 1980 oleh Dr Kary Mullis (Jalali, Saldanha and Jalali, 2017). Metode tradisional yang digunakan untuk amplifikasi DNA adalah dengan cara mengkloning urutan DNA menjadi vektor dan menggandakannya dalam sel hidup. Proses ini sering membutuhkan kerja sehari-hari atau berminggu-minggu, tetapi amplifikasi urutan DNA dengan PCR hanya membutuhkan beberapa jam. Sebagian besar analisis biokimia, termasuk deteksi asam nukleat dengan radioisotop, memerlukan masukan bahan biologis dalam jumlah yang signifikan, proses PCR memerlukan sangat sedikit. PCR mempunyai kemampuan mengenali sekuens DNA secara spesifik, kemudian mensintesis secara cepat dan akurat menjadi beberapa kopi DNA. PCR mampu mengamplifikasi DNA sekuens dalam jumlah sedikit menjadi jumlah kopi yang banyak. Proses penggandaan DNA dalam PCR cukup akurat, sehingga banyak digunakan dalam analisis genetik, diagnosis klinik, rekayasa genetik dan analisis forensik. Dalam bab ini kita akan membahas bagaimana PCR bekerja.

### **Prinsip PCR**

Proses kerja PCR hampir sama dengan proses replikasi DNA didalam tubuh. Replikasi DNA merupakan suatu proses fisiologis yang digunakan oleh semua sel hidup untuk menduplikasi materi genetik sebelum pembelahan sel. Komponen utama yang digunakan dalam proses PCR adalah: (1) DNA Template (DNA cetakan), (2) DNA Polimerase, (3) primer dan (4) nukleotida (Tabel 15.1).

**Tabel 15.1 Komponen PCR** (Jalali, Saldanha and Jalali, 2017)

Komponen PCR	Keterangan
DNA Template	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kualitas dan kemurniannya harus baik</li> <li>- Kemurnian DNA yang baik: <math>A_{260}/A_{280}</math> dengan rasio antara 1.7–2.0</li> <li>- Digunakan 1ng-1<math>\mu</math>g per 50 <math>\mu</math>l</li> <li>- Adanya kontaminasi DNA akan mengurangi efisiensi</li> </ul>
DNA Polimerase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzim yang sering digunakan selama proses PCR adalah Taq DNA Polimerase</li> <li>- Digunakan 0.5–2U per 50<math>\mu</math>L</li> <li>- Suhu optimal aktivitas untuk Taq DNA Polimerase adalah 75°C</li> <li>- Diperlukan penambahan magnesium yang berfungsi sebagai ko-faktor untuk Taq DNA Polimerase.</li> </ul>
Primer DNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Panjang primer 20-30 nukelotida</li> <li>- GC konten 40-60%</li> <li>- <i>Temperature melting</i> (<math>T_m</math>): 42–65°C, perbedaan <math>T_m</math> antar primer tidak boleh lebih dari 5°C.</li> </ul>
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT)	Konsentrasi setiap dNTP dalam campuran reaksi PCR harus sama.
<p><i>Template DNA berisi sekuens DNA yang digunakan dalam amplifikasi PCR. DNA Polimerase berfungsi mengkat alis sintesis rantai DNA. Primer adalah short single-stranded molekul DNA yang berikatan secara komplemen dengan untai DNA template.</i></p>	

Siklus dalam proses PCR, terdiri dari 3 tahap:

1. Denaturasi

Selama denaturasi sampel DNA yang *double stranded* akan dikonvert menjadi *single stranded* DNA dengan menggunakan panas 95°C. Panas yang tinggi akan memotong ikatan hydrogen pada DNA. Proses Denaturasi berlangsung sekitar 1-2 menit dengan suhu 95°C (Gambar 15.1), kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C (masuk ke proses annealing) (Lorenz, 2012).

2. Annealing

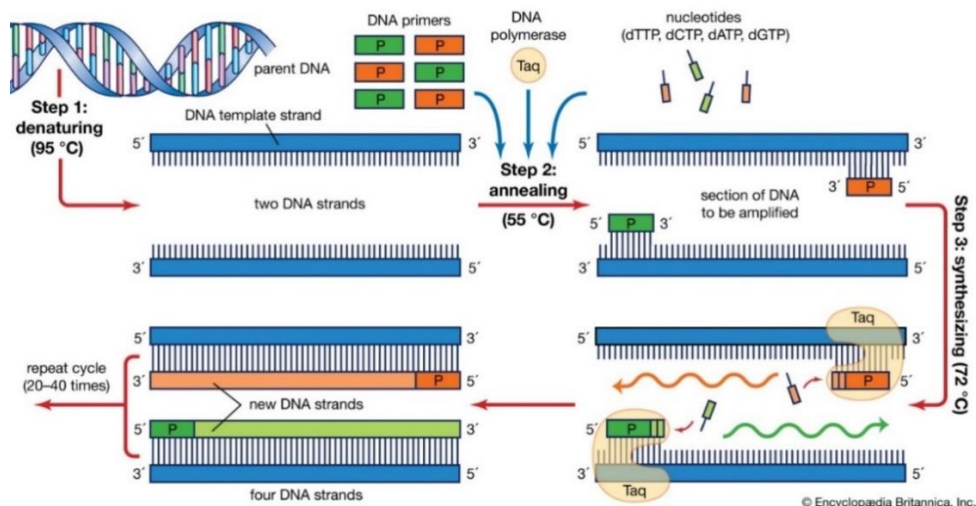
Tahapan kedua dalam siklus PCR adalah annealing, selama annealing primer akan menempel pada sekuens DNA. Primer akan menempel pada lokasi tertentu pada DNA template untai tunggal melalui ikatan hidrogen (suhu yang tepat tergantung pada suhu  $T_m$  primer yang digunakan) (Gambar 15.1). Penentuan

suhu annealing yang tepat sangat penting, karena efisiensi dan spesifisitas sangat dipengaruhi oleh suhu annealing. Suhu annealing biasanya akan efisien pada suhu rendah (37°C), tetapi suhu yang rendah mungkin membuat primer tidak menempel dengan sempurna atau menempel ditempat yang salah (*mispriming*). Suhu yang lebih tinggi, dapat meningkatkan spesifitas reaksi amplifikasi, tetapi menyebabkan efisiensinya menurun. Suhu annealing sebaiknya 3-50C dibawah suhu Tm primer (Cara menghitung Tm primer :  $T_m \approx 4(G-C) + 2(A-T)$ )(Lorenz, 2012).

Ada dua Primer yang digunakan dalam PCR, yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Setelah dilakukan annealing oligonukleotida primer dengan DNA cetakan, suhu inkubasi dinaikkan menjadi 72°C (masuk tahapan Extension).

### 3. Extension/Elongation

Extension adalah tahapan ketiga dalam proses PCR, suhu yang digunakan pada extension adalah 72°C. Selama tahapan ini DNA Polimerase akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Setelah terjadi polimerasi, rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hydrogen dengan DNA cetakan (Gambar 15.1).



**Gambar 15.1 Siklus dalam PCR** (Britanica, 2020)

Reaksi-reaksi seperti yang sudah dijelaskan, akan diulangi lagi sampai 20-35 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda

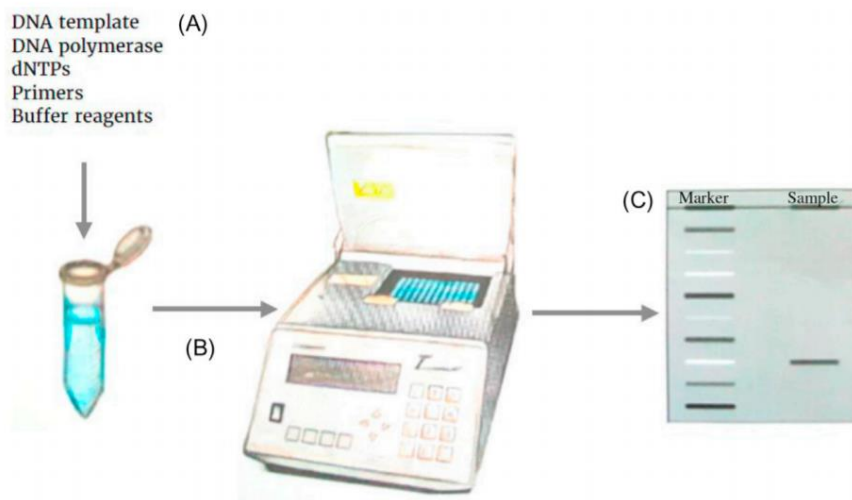
yang baru hasil polimerasi dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan jumlah DNA cetakan yang digunakan diawal.

Contoh pengaturan siklus pada mesin PCR:

Tahapan Siklus	Suhu	Waktu	Jumlah siklus
Denaturasi awal	95 °C	1 menit	1
Denaturasi	95 °C	30 detik	25-35
Annealing	55 °C (tergantung T <sub>m</sub> Primer)	30 detik	
Extension	72 °C	30 detik	
Final Extension	72 °C	5 menit	1
Hold	4 °C	∞	1

## Analisis Produk PCR

Produk PCR atau amplicon dapat divisualisasikan dan dianalisis menggunakan Elektroforesis gel agarose. Elektroforesis akan memisahkan produk DNA berdasarkan ukuran dan muatannya. Elektroforesis gel melakukan pemisahan molekul bermuatan dalam medan listrik pada agarosegel, diikuti oleh pewarnaan dengan etidium bromida (Gambar 15.2).



**Gambar 15.2. PCR experimental design.** (A) Proses *Polymerase chain reaction* (PCR) memerlukan beberapa komponen yaitu DNA template, DNA Polimerase, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) dan oligonucleotide primers. (B) PCR mix ditempatkan dalam mesin thermal cycler. (C) Ukuran fragmen DNA dapat dilihat dengan menggunakan elektroforesis gel. Molekul DNA bermuatan negatif dan akan bergerak ke kutub positif, prinsip ini memungkinkan proses pemisahan dapat berjalan (Clark, 2010).

## Fase PCR

Reaksi PCR dapat dibagi menjadi tiga fase:

a. Eksponensial

Pada setiap siklus, jumlah produk digandakan (dengan asumsi efisiensi reaksi 100%). Setelah 30 siklus, satu salinan DNA dapat ditingkatkan hingga 1.000.000.000 (satu miliar) salinan (Schochetman, Ou and Jones, 1988). Jadi, dalam arti tertentu, replikasi untaian DNA yang terpisah sedang dimanipulasi dalam tabung di bawah kondisi yang terkendali.

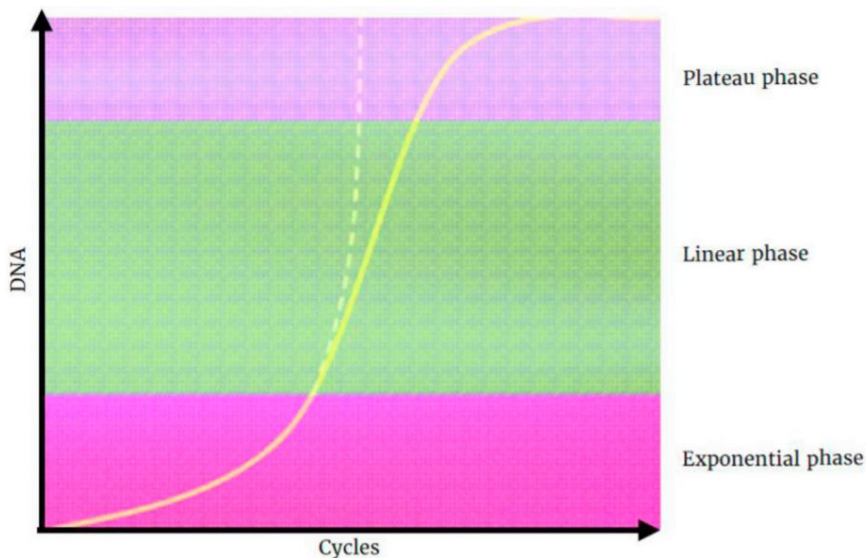
b. Linier

Selama fase linier, komponen-komponen PCR dalam reaksi mulai habis, akibatnya reaksi menjadi melambat.

c. Plateu

Pada fase plateu, reaksi berhenti dan tidak ada lagi produk yang dihasilkan.

Berkurangnya reagen (komponen PCR) akan terjadi pada kecepatan yang berbeda-beda, karena kinetika reaksi yang berbeda disetiap tabung PCR. Tingkat berkurangnya reagen (komponen PCR) bervariasi, dan setiap sampel akan berhenti di titik berbeda. Contoh, DNA template (cetakan) akan habis dengan nomor salinan yang berbeda di fase plateu, meskipun dimulai dengan kuantitas yang sama. Fase dalam PCR yang digunakan untuk analisis data adalah fase eksponensial, karena menghasilkan data kualitatif berkualitas tinggi. PCR konvensional mengukur data dari fase linier dan fase plateu. Oleh karena itu, data dari PCR konvensional hanya dianggap sebagai data semi-kuantitatif.



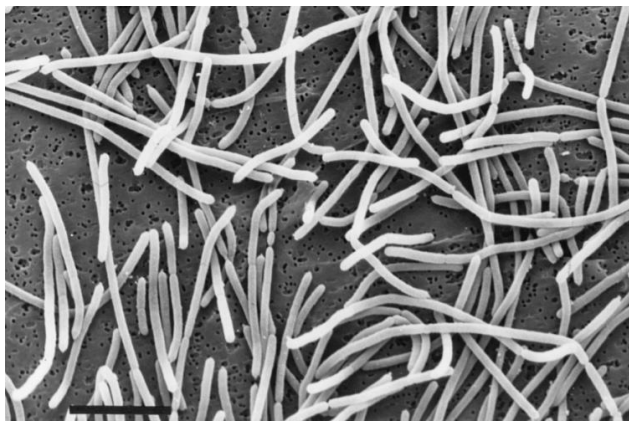
**Gambar 15.3** Fase amplifikasi selama proses PCR (Clark, 2010)

## **TaqDNA Polimerase**

Sebelum ditemukannya DNA polimerase termostabil, para peneliti harus dengan susah payah mengisi ulang reaksi dengan enzim baru (seperti Klenow atau T4 DNA polimerase) setiap siklus denaturasi. DNA Polimerase termostabil merevolusi dan mempopulerkan PCR karena kemampuannya untuk menahan suhu denaturasi yang tinggi. Penggunaan polimerase DNA termostabil juga memungkinkan suhu annealing yang lebih tinggi. Polimerase DNA termostabil dapat digunakan baik untuk RT-PCR satu enzim atau dua enzim. Misalnya, Tth DNA polimerase dapat bertindak sebagai *reverse transcriptase* dengan adanya  $Mn^{2+}$ .

DNA Polimerase merupakan enzim kunci dalam replikasi dan perbaikan DNA tingkat seluler. Di antara enam keluarga polimerase DNA, enzim A-Family berfungsi dalam replikasi DNA, perbaikan dan pemrosesan fragmen Okazaki selama sintesis *lagging strand*. *Thermus aquaticus* DNA polimerase I (Taq Pol) adalah polimerase DNA A-Family termostabil yang telah menjadi subjek banyak penelitian baik secara struktural dan kinetik.

*Taq* DNA Polimerase berasal dari bakteri *Thermus aquaticus* BM (Gambar 15.4). *Taq* DNA Polimerase memiliki berat molekul kurang lebih 95 kD, enzim ini mempunyai kemampuan polimerasi DNA yang tinggi, tetapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease 3' → 5'. Kelebihan *Taq* DNA Polimerase adalah enzim ini tahan terhadap suhu tinggi, suhu tinggi diperlukan untuk memisahkan ikatan DNA template (Kadri, 2020). *Taq* DNA Polimerase biasanya digunakan untuk mengamplifikasi produk PCR sebesar 5kb atau kurang. Produk PCR dalam kisaran 5–10kb dapat diamplifikasi dengan *Taq* DNA Polimerase tetapi seringkali membutuhkan lebih banyak pengoptimalan daripada produk PCR yang lebih kecil. *Taq* DNA polimerase adalah enzim prosesif dengan kecepatan ekstensi > 60 nukleotida / detik pada suhu 70°C. Enzim ini memiliki waktu paruh 40 menit pada suhu 95°C.

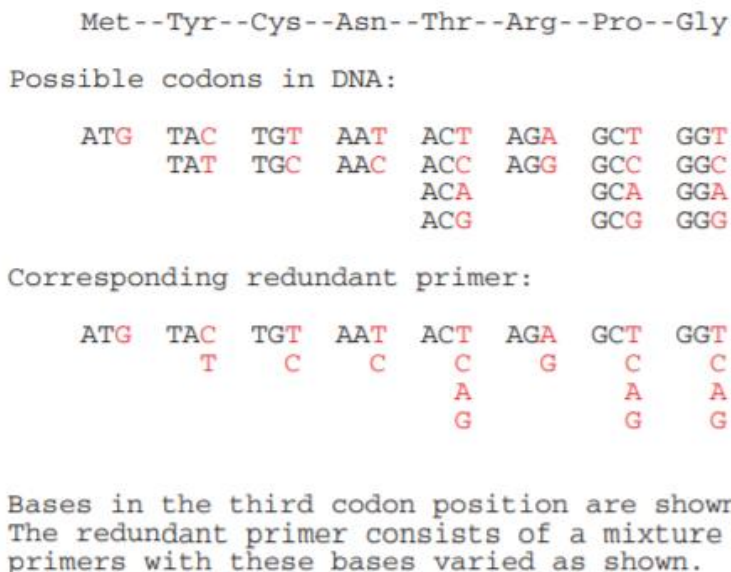


**Gambar 15.4** Bakteri *Thermus aquaticus*BM (Beffa *et al.*, 1996)

## Degenerate Primer

Informasi sekuens diperlukan untuk membuat primer PCR. Degenerate primer digunakan ketika informasi urutan parsial tersedia, tetapi urutan lengkapnya tidak diketahui. Misalnya, kita mungkin memiliki urutan gen dari satu organisme dan tertarik untuk mendapatkan gen yang sesuai dari organisme lain. Jika dua organisme terkait, urutan DNA mereka untuk gen tertentu akan dekat, meskipun jarang identik. Lebih lanjut, kode genetik mengalami degenerasi dan beberapa kodon dapat mengkode asam amino yang sama. Secara khusus, banyak famili kodon berbagi dua basa pertama dan hanya bervariasi pada posisi ketiga. Karena urutan protein, bukan DNA, yang paling penting untuk fungsi, sebagian besar variasi antara gen yang berkerabat dekat berada pada posisi kodon ketiga (Gambar 15.5).

Oleh karena itu, degenerate primer DNA dibuat yang memiliki campuran semua kemungkinan basa di setiap posisi ketiga. Primer yang mengalami degenerate sebenarnya adalah campuran dari primer yang terkait erat. Agaknya salah satu primer dalam campuran akan mengenali DNA dari gen yang diinginkan. Selain itu, pasangan yang sempurna sebenarnya tidak terlalu diperlukan. Jika, katakanlah, 18 atau 19 dari 20 basa berpasangan, primer akan bekerja dengan baik. Banyak segmen DNA telah berhasil diamplifikasi dengan PCR menggunakan data sekuens dari kerabat dekat.



**Gambar 15.5 Degenerate DNA Primers.** Degenerate primers digunakan jika hanya informasi urutan DNA parsial yang tersedia. Seringkali, seperti di sini, urutan asam amino pendek dari protein diketahui. Karena banyak asam amino dikodekan oleh beberapa kodon alternatif, sekuens pengkodean DNA yang disimpulkan menjadi ambigu. Misalnya, tirosin asam amino dikodekan



oleh TAC atau TAT. Oleh karena itu, basa ketiga ambigu dan ketika primer disintesis, campuran 50: 50 C dan T akan disisipkan pada posisi ini. Ambiguitas ini terjadi untuk semua basa yang ditampilkan dalam warna merah, menghasilkan kumpulan primer dengan urutan yang berbeda namun terkait. Diharapkan, salah satu dari primer ini akan memiliki basa komplementer yang cukup untuk mendukung urutan target yang akan diamplifikasi (Clark, 2010).

Degenerate DNA primers harus digunakan jika hanya urutan protein yang tersedia. Dalam hal ini, urutan protein diterjemahkan ke belakang untuk menghasilkan urutan DNA yang sesuai. Karena degenerate kode genetik beberapa kemungkinan akan ada untuk urutan DNA yang sesuai dengan urutan polipeptida tertentu. Sebagian besar ambiguitas berada pada posisi kodon ketiga. Urutan ambigu ini dapat digunakan untuk membuat degenerate primer, seperti sebelumnya.

## **Faktor-Faktor yang Menentukan Keberhasilan PCR**

Keberhasilan PCR ditentukan oleh beberapa faktor seperti dNTP, Primer, DNA Template, Komposisi larutan Buffer, jumlah siklus dalam reaksi, Enzim yang digunakan, serta Faktor teknis dan non teknis lainnya.

### **1. Deoksiribonukleotida triphosphate (dNTP)**

Larutan stok dNTP sebaiknya dinetralkan terlebih dahulu menjadi pH 7,0 sebelum digunakan. Kemudian perlu juga diperiksa konsentrasi dNTP dengan menggunakan spektroskopi. Dalam proses PCR diperlukan konsentrasi masing-masing dNTP sekitar 20-200  $\mu\text{M}$  dan keempat dNTP yang digunakan sebaiknya harus memiliki konsentrasi yang sama. Konsentrasi yang sama dapat memperkecil kesalahan penggabungan nukleotida selama proses polimerasi.

### **2. Primer**

Konsentrasi optimal primer yang digunakan dalam reaksi PCR berkisar antara 0,1 -0,5  $\mu\text{M}$ . Konsentrasi Primer yang lebih tinggi dapat menyebabkan terakumulasinya hasil polimerisasi yang nonspesifik. Primer yang digunakan umumnya memiliki panjang oligonukleotida 18-28 nukleotida, dengan kandungan G+C sebesar 50-60%. Primer yang digunakan (*forward* dan *reverse*) sebaiknya mempunyai  $T_m$  (*Temperature melting*) yang serupa.  $T_m$  diartikan sebagai suhu saat setengah molekul DNA mengalami denaturasi.

### **3. DNA Template**

Jumlah DNA template yang digunakan sebaiknya berkisar  $10^5 - 10^6$  molekul. Jumlah DNA template yang diperlukan untuk amplifikasi agar berhasil bergantung pada kompleksitas sampel DNA. Misalnya, dari sebuah plasmid 4kb yang mengandung urutan target 1kb, 25% dari input DNA adalah target yang diinginkan. Sebaliknya,

urutan target 1kb dalam genom manusia ( $3,3 \times 10^9$ bp) mewakili sekitar 0,00003% input DNA. Jadi, sekitar 1.000.000 kali lipat lebih banyak DNA genom manusia yang diperlukan untuk mempertahankan jumlah salinan target yang sama per reaksi. Kesalahan umum termasuk menggunakan terlalu banyak DNA plasmid, terlalu banyak produk PCR atau terlalu sedikit DNA genom sebagai template. Reaksi dengan DNA template yang terlalu sedikit akan memiliki hasil yang rendah, sedangkan reaksi dengan cetakan DNA yang terlalu banyak dapat menyebabkan amplifikasi non spesifik.

#### 4. Komposisi Larutan Buffer

Kebanyakan buffer untuk reaksi terdiri dari *buffering agent*, seperti Tris-based buffer, garam, dan KCl. Buffer mengatur pH reaksi, yang mempengaruhi aktivitas dan ketepatan DNA polimerase. Konsentrasi KCl dalam jumlah sesuai akan meningkatkan aktivitas DNA polimerase sebesar 50-60% dibandingkan aktivitas tanpa adanya KCl; 50 mM KCl dianggap optimal. Buffer juga mengandung senyawa yang meningkatkan kepadatan sampel sehingga akan tenggelam ke dalam sumur gel agarosa, dan memungkinkan reaksi untuk langsung dimasukkan ke gel agarosa tanpa perlu memasukkan pewarna.

#### 5. Jumlah siklus dan reaksi

Dua parameter siklus yang paling sering diubah adalah suhu annealing dan waktu ekstensi. Waktu dan suhu untuk langkah lain dari siklus PCR biasanya tidak berbeda secara signifikan. Namun dalam beberapa kasus, siklus denaturasi dapat dipersingkat atau suhu denaturasi yang lebih rendah digunakan untuk mengurangi jumlah depurinasi, yang dapat menyebabkan mutasi pada produk PCR. Urutan primer merupakan faktor utama yang menentukan suhu annealing optimal, yang seringkali memiliki perbedaan  $5^\circ\text{C}$  dari suhu  $T_m$  primer. Menggunakan suhu annealing yang sedikit lebih tinggi daripada primer  $T_m$  akan meminimalkan primer non spesifik serta menurunkan jumlah produk yang tidak diinginkan disintesis.

Penggunaan suhu annealing yang lebih rendah dari  $T_m$  primer dapat menghasilkan hasil yang lebih tinggi, karena annealing primer lebih efisien pada suhu yang lebih rendah. Pengujian beberapa suhu annealing sebaiknya dimulai kira-kira  $5^\circ\text{C}$  di bawah  $T_m$ , untuk menentukan kondisi annealing terbaik. Dalam banyak kasus, amplifikasi nonspesifik dan pembentukan primer-dimer dapat dikurangi melalui optimalisasi suhu annealing, tetapi jika produk PCR yang tidak diinginkan tetap menjadi masalah, dapat dipertimbangkan untuk menggunakan PCR Hot-Start.

Panjang siklus ekstensi, yang mungkin perlu dioptimalkan bergantung pada ukuran produk PCR dan DNA polimerase yang digunakan. Secara umum, biarkan sekitar 1 menit untuk setiap 1kb ampikon (waktu ekstensi minimum = 1 menit) untuk DNA polimerase non-proofreading dan 2 menit untuk setiap 1kb ampikon untuk proofreading DNA polimerase. Hindari perpanjangan waktu yang terlalu lama, karena dapat meningkatkan kemungkinan timbulnya artefak yang terkait dengan aktivitas eksonuklease 5' → 3' intrinsik dari *Taq* DNA Polimerase. PCR biasanya melibatkan 25-35 siklus amplifikasi. Risiko produk PCR yang tidak diinginkan muncul seiring dengan peningkatan jumlah siklus.

6. Enzim yang digunakan

*Taq* DNA Polimerase yang digunakan dalam 50µl PCR mix adalah sekitar 1–1,25 unit. Penambahan jumlah unit enzim tidak akan meningkatkan hasil produk secara signifikan. Faktanya, peningkatan jumlah enzim meningkatkan kemungkinan menghasilkan artefak yang terkait dengan aktivitas eksonuklease 5' → 3' dari *Taq* DNA polimerase. Kesalahan pipetasi sering menjadi penyebab tingkat enzim yang berlebihan. Penambahan larutan enzim dalam volume kecil yang akurat sulit dilakukan, jadi alangkah baiknya menyiapkan campuran induk reaksi, yang membutuhkan volume yang lebih besar dari setiap reagen, untuk mengurangi kesalahan pipetasi.

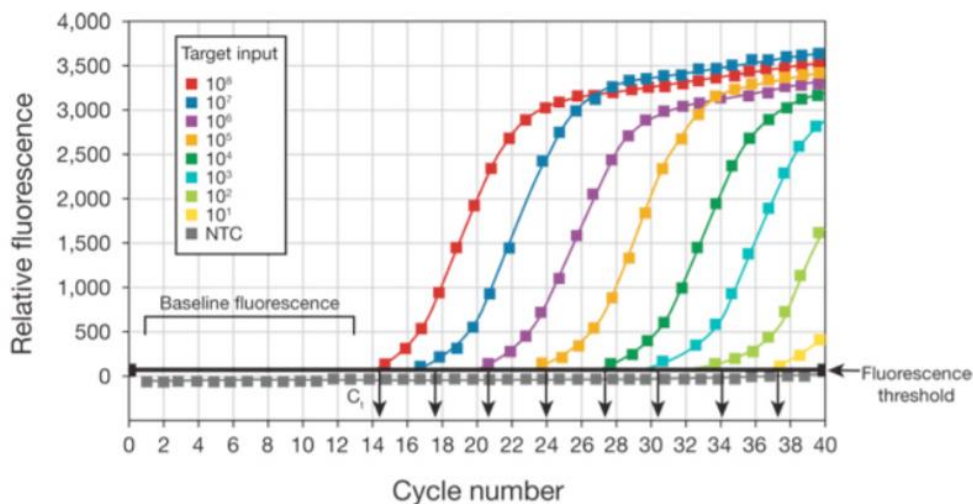
7. Kontaminasi Asam Nukleat

Penting untuk meminimalkan kontaminasi silang antar sampel dan mencegah terbawanya RNA dan DNA dari satu percobaan ke percobaan berikutnya. Gunakan area kerja dan pipet terpisah untuk langkah pra dan pasca amplifikasi. Kenakan sarung tangan, dan gantilah sesering mungkin.

## Jenis-Jenis PCR

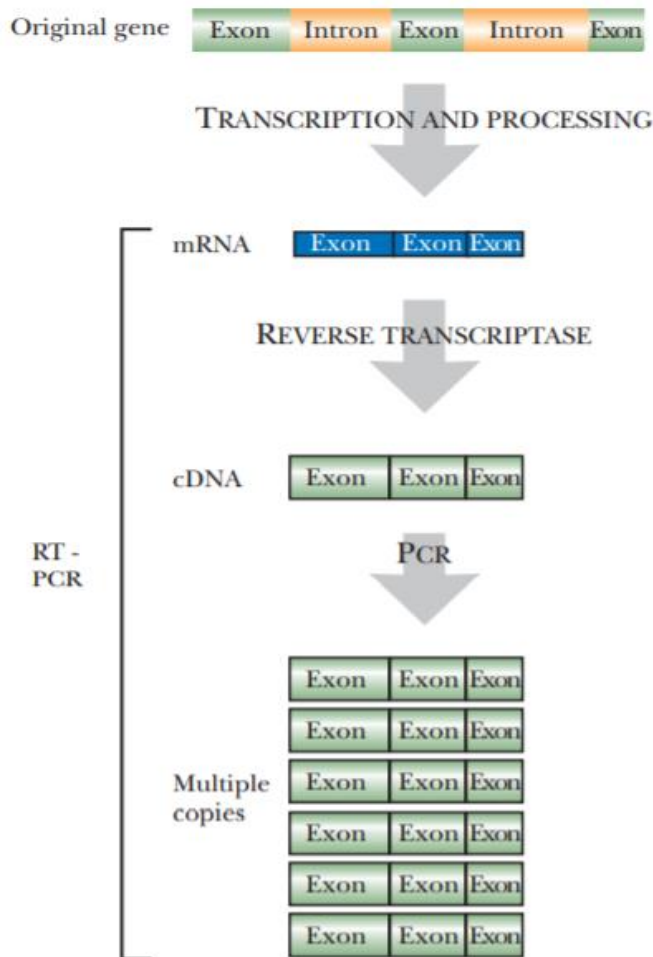
- a. *Quantitative PCR* (qPCR): digunakan untuk mengukur kuantitas urutan target (biasanya dalam *real-time*). qPCR secara kuantitatif mengukur jumlah awal DNA, cDNA, atau RNA. PCR kuantitatif biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA yang ada dalam sampel dan jumlahnya dalam sampel (Contoh hasil qPCR: Gambar 15.6). PCR kuantitatif memiliki tingkat presisi yang sangat tinggi. Metode PCR kuantitatif menggunakan pewarna fluoresen, seperti Sybr Green, EvaGreen atau probe DNA yang mengandung fluorofor, seperti TaqMan, untuk mengukur jumlah produk yang diamplifikasi secara real time. Kuantitatif PCR juga disingkat menjadi RT-PCR (*real-time*

PCR) tetapi singkatan ini digunakan untuk *Reverse transcription* PCR. qPCR sesuai untuk PCR kuantitatif (*PCR real time*).



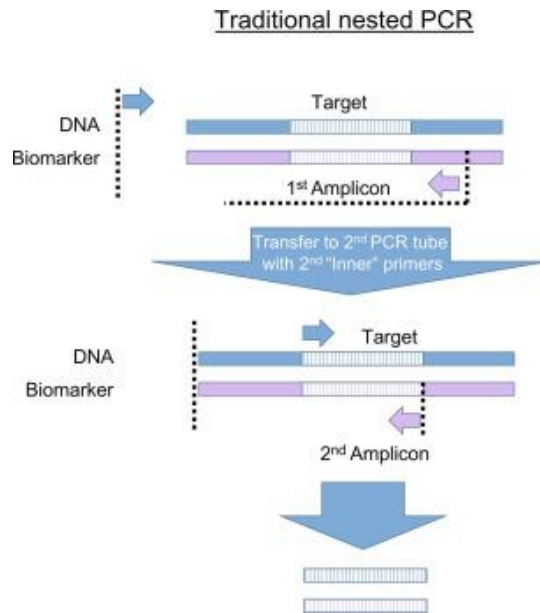
**Gambar 15.6 Hasil amplifikasi qPCR** (Life Technologies, 2015)

- b. *Reverse Transcription* PCR (RT-PCR): RT-PCR adalah prosedur dua langkah yang melibatkan pembuatan salinan cDNA dari mRNA, kemudian menggunakan PCR untuk amplifikasi cDNA (Gambar 15.7). Pertama, sampel mRNA (yang tidak memiliki intron) diisolasi. *Reverse transcriptase* digunakan untuk membuat salinan cDNA dari mRNA. Sampel cDNA kemudian diamplifikasi dengan PCR. Proses ini menghasilkan banyak salinan cDNA tanpa intron. RT-PCR banyak digunakan dalam profil ekspresi, untuk menentukan ekspresi gen atau untuk mengidentifikasi urutan transkrip RNA, termasuk situs awal dan penghentian transkripsi. Jika urutan DNA genom dari suatu gen diketahui, RT-PCR dapat digunakan untuk memetakan lokasi ekson dan intron dalam gen tersebut.



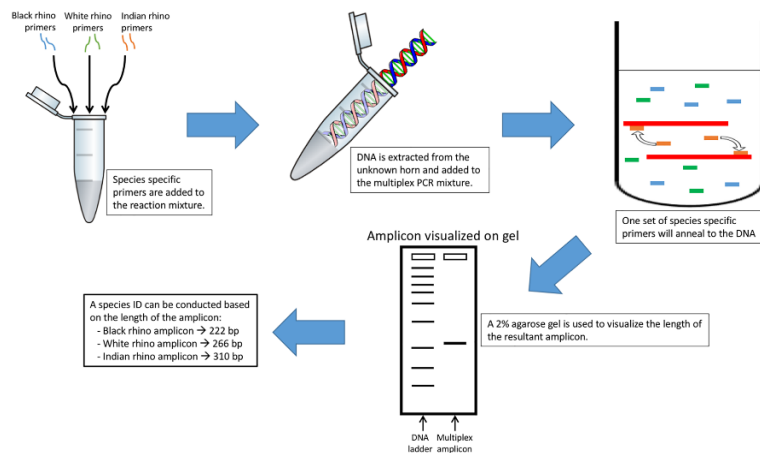
**Gambar 15.7 Tahapan Proses *Reverse Transcription PCR*** (Clark, 2010)

- c. *Nested PCR*: dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas PCR. Teknik ini menggunakan dua pasang primer amplifikasi dan dua putaran PCR. Dua set primer digunakan dalam dua proses PCR yang berurutan. Pada reaksi pertama, sepasang primer digunakan untuk menghasilkan produk DNA, selain target yang dituju, mungkin masih terdiri dari fragmen DNA yang tidak diamplifikasi secara spesifik. Produk kemudian digunakan dalam PCR kedua dengan satu set primer yang lokasi pengikatnya berbeda seluruhnya atau sebagian. Sensitivitas yang meningkat muncul dari jumlah siklus total yang tinggi, dan peningkatan spesifisitas muncul dari annealing set primer kedua hingga urutan yang dihasilkan oleh siklus pertama (Gambar 15.8).



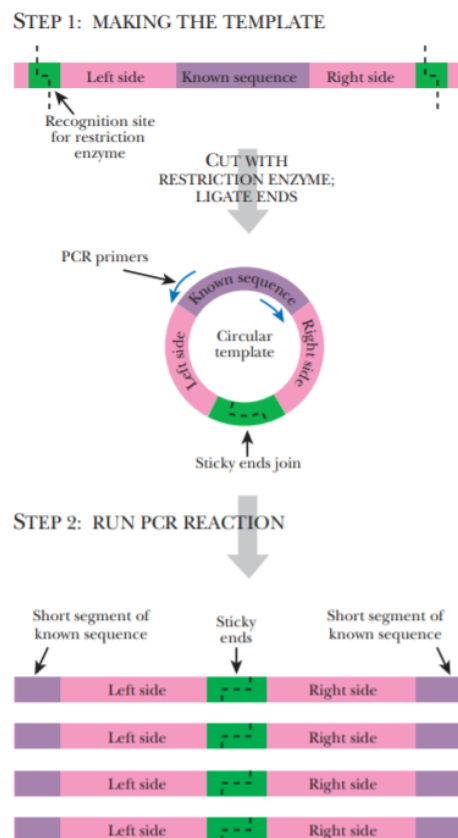
**Gambar 15.8 Tahapan Proses *Nested* PCR (Shen, 2019)**

- d. *Multiplex-PCR*: terdiri dari beberapa set primer dalam satu campuran PCR. *Multiplex-PCR* berfungsi untuk menghasilkan amplicon dengan berbagai ukuran yang khusus untuk urutan DNA yang berbeda. Dengan menargetkan beberapa gen sekaligus, informasi tambahan dapat diperoleh dari satu uji coba yang sebaliknya akan membutuhkan beberapa kali reagen dan lebih banyak waktu untuk melakukan. Suhu annealing untuk masing-masing set primer harus dioptimalkan agar bekerja dengan benar dalam satu reaksi, dan ukuran amplicon. Artinya, panjang pasangan basa mereka harus cukup berbeda untuk membentuk pita yang berbeda ketika divisualisasikan dengan elektroforesis gel.



**Gambar 15.9 Tahapan Proses *Multiplex-PCR* (Ewart *et al.*, 2018)**

- e. *Inverse PCR*: Pendekatan lain yang menggunakan informasi urutan tidak lengkap untuk amplifikasi gen target adalah *Inverse PCR*. Syarat penggunaan teknik *Inverse PCR* adalah urutan bagian dari molekul DNA yang panjang, misalnya kromosom, diketahui. Tujuannya adalah untuk memperluas analisis di sepanjang molekul DNA ke daerah yang tidak diketahui. Biasanya untuk mensintesis primer untuk PCR, target yang tidak diketahui urutannya harus diapit oleh dua wilayah urutan yang diketahui. Dalam Teknik *Inverse PCR* justru kebalikan dari itu. Target molekul DNA diubah menjadi lingkaran. Mengitari lingkaran membawa membuat kembali ke awal. Efeknya, meskipun, hanya satu bentangan kecil urutan yang diketahui, bentuk melingkar memungkinkan memiliki satu wilayah di kedua sisi urutan target.



**Gambar 15.10 Tahapan Proses *Inverse* -PCR** (Clark, 2010)

Enzim restriksi, biasanya yang mengenali urutan enam basa, digunakan untuk membuat lingkaran. Enzim ini tidak boleh memotong ke dalam urutan yang diketahui, oleh karena itu, pada akhirnya, enzim ini akan memotong bagian hulu atau hilir dari daerah yang diketahui. Fragmen yang dihasilkan akan memiliki

urutan pertama yang tidak diketahui, urutan yang diketahui ditengah, diikuti oleh urutan yang lebih tidak diketahui. Kedua ujung fragmen akan memiliki ujung *sticky end* yang kompatibel untuk membuat lingkaran DNA. Dua primer sesuai dengan wilayah yang diketahui dan menghadap ke luar mengelilingi lingkaran digunakan untuk PCR. Sintesis DNA baru akan dilanjutkan di sekitar lingkaran searah jarum jam dari satu primer dan berlawanan arah jarum jam dari primer lainnya. Secara keseluruhan, inverse PCR memberikan banyak salinan dari segmen DNA yang mengandung beberapa DNA kekanan dan beberapa DNA di sebelah kiri dari wilayah asli yang diketahui (Gambar 15.10).

- f. *Hot start PCR*: teknik yang mengurangi amplifikasi non-spesifik selama tahap penyiapan awal PCR. *Hot start PCR* dapat dilakukan secara manual dengan memanaskan komponen reaksi ke suhu denaturasi (misalnya 95°C) sebelum menambahkan polimerase. Sistem enzim khusus telah dikembangkan untuk menghambat aktivitas polimerase pada suhu kamar, baik dengan pengikatan antibodi atau dengan adanya inhibitor yang terikat secara kovalen yang hanya terdisosiasi pada aktivasi suhu tinggi. *Hot-start PCR / cold-finish* dicapai dengan polimerase hibrid baru yang tidak aktif pada suhu kamar dan langsung diaktifkan pada suhu elongasi.
- g. *Intersequence-specific PCR (ISSR)*: Metode PCR untuk DNA fingerprinting yang mengamplifikasi regions diantara sekuens DNA pendek yang berulang untuk mendapatkan sekuens *fingerprint* yang unik, kemudian fragmen ini diamplifikasi.
- h. *Single Specific Primer-PCR (SSP-PCR)*: memungkinkan amplifikasi DNA untai ganda bahkan ketika informasi sekuens hanya tersedia di satu ujung. Metode ini memungkinkan amplifikasi gen yang hanya tersedia informasi sekuens parsial, dan memungkinkan genom searah berjalan dari daerah yang diketahui ke daerah kromosom yang tidak diketahui.

## Penyiapan Sampel DNA

Ekstraksi DNA dari sampel darah

Metode ekstraksi ini berdasarkan *protocol* dari QIAamp DNA MINI KIT (QIAGEN, 2016)

1. Sebanyak 20 µl Qiagen Protease atau Proteinase K dipipet ke dalam tube 1,5 ml.
2. Kemudian ditambahkan 200 µl sampel darah.
3. Tambahkan 200 µl Buffer AL ke dalam sampel. Vortex selama 15 detik.



4. Inkubasi pada suhu 56<sup>0</sup>C selama 10 menit, kemudian sentrifuge sebentar.
5. Tambahkan 200 µl Etanol absolut, vortex selama 15 detik, kemudian sentrifuge sebentar.
6. Campuran sampel kemudian dimasukkan ke dalam QIAamp Mini Spin Column, kemudian sentrifugasi pada kecepatan 6000x g selama 1 menit. Filtrat dibuang. Pindahkan Column ke *collection* tube yang baru.
7. Tambahkan 500 µl AW1, kemudian sentrifugasi 6000x g selama 1 menit. Filtrat dibuang.
8. Tambahkan 500 µl AW 2, kemudian sentrifugasi pada kecepatan maksimal 14.000x g selama 1 menit. Filtrat dibuang.
9. Sentrifugasi coloumn dalam keadaan kosong dengan kecepatan maksimal 14.000x g selama 1 menit.
10. Pindahkan QIAamp Mini Spin Coloumn ke dalam tube 1,5 mL yang baru. Kemudian tambahkan 50-100 µl Buffer AE, inkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit, kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 6000x g selama 1 menit.
11. Larutan DNA dapat disimpan di suhu -20<sup>0</sup>C.

## Penyiapan Sampel RNA

RNA dapat diekstraksi dalam 30-60 menit menggunakan metode yang disajikan di bawah ini diadaptasi dari metode yang dikembangkan oleh Chomezynski dan Mackey (Chomezynski and Mackey, 1995). Protokol ini menggunakan Reagen TRIzol, yang dirancang untuk mengisolasi RNA total berintegritas tinggi.

### Homogenisasi

1. Untuk jaringan, tambahkan 1 mL TRIzol per 50-100 mg sampel jaringan. Homogenisasi sampel menggunakan homogenizer.  
Untuk sel yang sedang ditumbuhkan, suspensi sel disentrifuge pada 300xg selama 5 menit, supernatant dibuang. Kemudian pada pellet sel ditambahkan 0,75 mL TRIzol per 0,25 mL sampel.
2. *Re-suspend* lysate menggunakan 1mL pipette tip.
3. Inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.
4. Apabila bekerja di *fume hood*, tambahkan 200µL kloroform per 2mL Reagen TRIzol.
5. Vortex samples selama 15 detik dan inkubasi pada suhu ruang selama 3 menit.

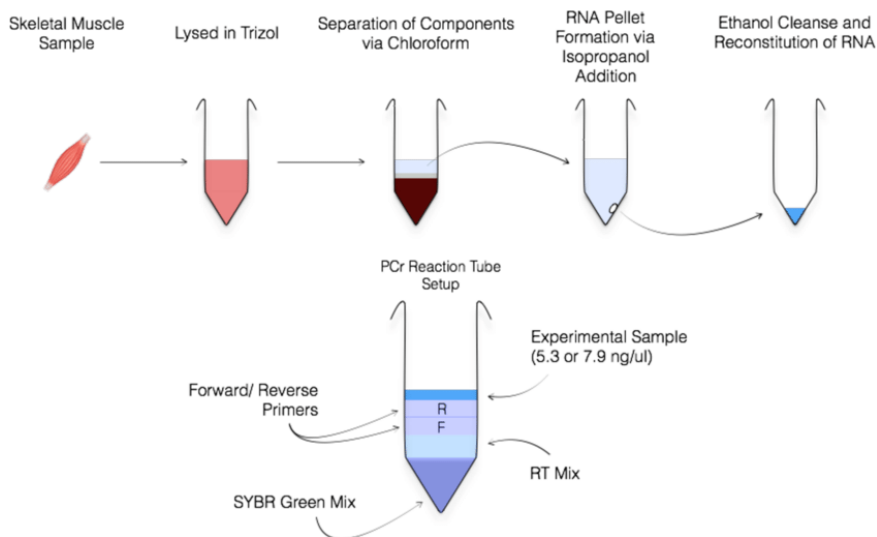
6. Sentrifuge sampel dengan kecepatan 12.000x g selama 15 menit pada suhu 4°C. Campuran akan terpisah menjadi 3 *phase*, bagian bawah red phenol-chloroform *phase*, interphase, dan aqueous *phase* yang terdapat RNA (Gambar 15.12).
7. Pindahkan aqueous *phase* pada tube baru.

### RNA precipitation

8. Tambahkan 500µL isopropanol 100% pada tube dan inkubasi sampel pada suhu ruang selama 10 menit.
9. Sentrifuge dengan kecepatan 12.000× g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet RNA akan mengendap di sisi dasar tube.

### RNA wash dan resuspension

10. Buang supernatant dan cuci presipitasi dengan menambahkan 1 ml etanol 75%. Vortex sampel.
11. Sentrifuge sampel pada kecepatan 7.500x g selama 5 menit pada suhu 4°C.
12. Buang supernatant, biarkan beberapa menit sampai etanol kering.
13. Tambahkan RNAase-free water (20–50µL).
14. Simpan di suhu -80°C.



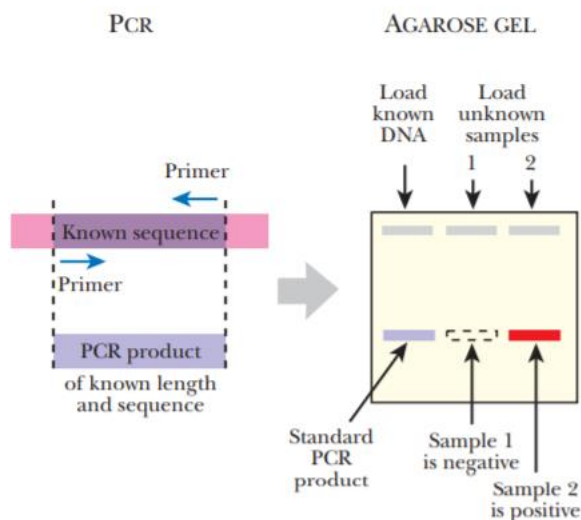
**Gambar 15.11 Tahapan Proses Ekstraksi RNA** (Seaborne, 2018)

Menilai kuantitas, kemurnian, dan integritas RNA dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer seperti "Nanodrop". Absorbansi ultraviolet pada 260 nm digunakan untuk mengukur jumlah asam nukleat dalam sampel. Pembacaan A260 dari 10 setara dengan sekitar 40µg / mL RNA. Kemurnian RNA ditentukan dari absorbansi relatif pada

260 dan 280nm. Rasio A260 / 280 yang lebih besar dari 1,8 (1,8-2,0) sudah dinilai memiliki kemurnian yang baik Untuk menentukan integritas atau kualitas RNA, kita dapat melihat intensitas pita rRNA pada gel agarose (Edelmann, Niedner and Niessing, 2014).

## Aplikasi PCR Untuk Diagnosis

PCR dapat digunakan untuk mengidentifikasi sampel darah, jaringan, atau rambut yang tidak diketahui pemiliknya. Pertama, urutan DNA tertentu harus ditentukan dari organisme. Misalnya, jika kita ingin menentukan apakah sampel darah yang tidak diketahui berasal dari manusia, maka urutan unik dari manusia harus ditentukan. Karena banyak genom berbeda yang sedang diurutkan, data ini dapat diperoleh dengan mudah. Selanjutnya, dua primer harus dirancang dan disintesis menggunakan informasi sekuens. Sampel kecil DNA yang tidak diketahui asalnya kemudian dapat diuji dengan PCR menggunakan primer ini. Setelah reaksi PCR. DNA yang dihasilkan *dirunning* pada gel agarosa untuk memisahkannya sesuai ukurannya. Jika sampel DNA yang diuji berisi target atau urutan yang diketahui, produk PCR akan memiliki panjang yang diprediksi (misalnya, Gambar 15.13; sampel No. 2 yang tidak diketahui). Jika tes DNA bukan dari organisme yang sama, tidak ada pita yang akan dihasilkan (misalnya, Gambar 15.13; sampel tidak diketahui No. 1).



**Gambar 15.12. PCR digunakan untuk Mendiagnosis.** Keterkaitan Genetik PCR dapat menentukan identitas sampel DNA yang tidak diketahui. Pada gambar ini, dua sampel DNA yang tidak diketahui diisolasi dan diampifikasi menggunakan PCR. Primer yang digunakan untuk menguji sampel DNA ini spesifik untuk urutan yang diketahui (merah muda). Pada sampel 1, tidak

ada produk PCR yang dibuat. Oleh karena itu, sampel tidak mengandung DNA dengan urutan yang diketahui (merah muda). Sampel 2 menunjukkan produk PCR dengan ukuran yang diprediksi untuk urutan yang diketahui (Clark, 2010).

Kunci dari eksperimen ini adalah primer dan seberapa baik primer menempel pada urutan target. PCR dapat digunakan dalam berbagai uji diagnostik. Misalnya, gejala AIDS yang terlihat hanya muncul dalam waktu lama setelah terinfeksi, seringkali beberapa tahun. Namun, dengan menggunakan primer PCR khusus untuk urutan yang hanya ditemukan dalam genom HIV, para ilmuwan dapat menguji DNA HIV dalam sampel darah, meskipun tidak ada gejala yang terlihat. Contoh lainnya adalah tuberkulosis. Tidak seperti banyak bakteri, *Mycobacterium*, yang menyebabkan penyakit ini, tumbuh sangat lambat. Awalnya, untuk menguji tuberkulosis, bakteri dibiakkan di cawan petri yang berisi media pertumbuhan untuk *Mycobacterium*, tetapi tes ini memakan waktu hampir sebulan. Sebaliknya, identifikasi DNA mikobakteri dengan PCR dapat dilakukan dalam sehari. Diagnosis medis yang lebih cepat sangat penting untuk membantu mencegah penyebaran dan perkembangan penyakit. PCR adalah alat yang efektif untuk mengamplifikasi DNA dalam jumlah kecil.

DNA dari 1/100 mililiter darah manusia mengandung sekitar 100.000 salinan dari setiap kromosom. Jika urutan target untuk PCR adalah 500 pasang basa, maka ada sekitar sepersepuluh pikogram ( $10^{-12}$  gram) berat dari urutan target. Proses PCR yang baik akan memperkuat urutan target dan menghasilkan mikrogram ( $10^{-6}$  gram) atau lebih DNA. Satu mikrogram mungkin tidak tampak banyak tetapi cukup untuk sekuensing lengkap atau kloning. Jadi dengan PCR, memungkinkan untuk mengidentifikasi suatu organisme dari sampel yang sedikit mengandung materi DNA. Teknik ini telah merevolusi sistem peradilan pidana dengan memungkinkan identifikasi individu yang sangat akurat dari sampel yang sangat kecil.

## **Aplikasi PCR**

PCR memiliki dapat diaplikasi dalam penelitian, biologi, kedokteran, dan arkeologi. Beberapa aplikasi paling umum tercantum, contohnya:

1. PCR dapat digunakan untuk menyelidiki bagaimana ekspresi gen berubah pada diferensiasi sel, perubahan lingkungan, atau paparan berbagai obat.
2. PCR memainkan peran utama dalam kloning dan sekuensing.
3. Digunakan untuk karakterisasi dan deteksi organisme penyakit menular.
4. Dengan pengujian genetik, calon orang tua mungkin diuji untuk melihat apakah mereka membawa penyakit genetik tertentu.

5. Pembuatan profil DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu dari sampel DNA tiap individu. Bukti forensik penting di tempat kejadian perkara yang hanya ada dalam jumlah yang sangat kecil, misalnya sehelai rambut manusia. Sampel ini dapat dengan cepat diamplifikasi dengan PCR, dan kemudian dibandingkan dengan DNA tersangka, atau dengan DNA historis dalam database polisi.
6. PCR memainkan peran utama dalam produksi protein rekombinan seperti insulin.
7. Aplikasi PCR terkait lingkungan seperti pengujian kemurnian air, dan dalam arkeologi untuk mengamplifikasi DNA yang sering terdegradasi dengan buruk oleh waktu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Beffa, T. *et al.* (1996) 'Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80°C)', *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), pp. 1723–1727. doi: 10.1128/aem.62.5.1723-1727.1996.
- Britanica (2020) 'polymerase chain reaction | Definition & Steps | Britannica'. Available at: <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>.
- Chomczynski, P. and Mackey, K. (1995) 'Short Technical Reports'. *Biotechniques*, pp. 942–945.
- Clark, D. (2010) *Academic Cell: Molecular Biology*. Academic Press publications.
- Edelmann, F. T., Niedner, A. and Niessing, D. (2014) 'Production of pure and functional RNA for in vitro reconstitution experiments', *Methods*, pp. 333–341. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.08.034.
- Ewart, K. M. *et al.* (2018) 'A rapid multiplex PCR assay for presumptive species identification of rhinoceros horns and its implementation in Vietnam', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0198565.
- Jalali, Morteza, Saldanha, F. Y. L. and Jalali, Mehdi (2017) 'Basic Science Methods for Clinical Researchers', *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, pp. 1–355.
- Kadri, K. (2020) 'Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications | IntechOpen', *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. Available at: <https://www.intechopen.com/books/synthetic-biology-new-interdisciplinary-science/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-and-applications>.

- Life Technologies (2015) 'Realtime PCR handbook', *Realtime PCR handbook*, pp. 1–68. doi: 10.1006/excr.2001.5278.
- Lorenz, T. C. (2012) 'Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies', *Journal of Visualized Experiments*, (63), pp. 1–15. doi: 10.3791/3998.
- QIAGEN (2016) 'QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook', *Qiagen*, (5), pp. 1–72. Available at: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>.
- Schochetman, G., Ou, C. and Jones, W. K. (1988) 'Polymerase Chain Reaction five years have yielded practical probe-based assays', 158(6), pp. 1154–1157.
- Seaborne, R. A. E. (2018) 'The Role of DNA Methylation in the Regulation of Skeletal Muscle Atrophy, Hypertrophy and Epigenetic Memory', (May), p. 25.
- Shen, C.-H. (2019) 'Diagnostic Molecular Biology - 1st Edition'. Academic Press, p. 472.

-oo00oo-

# PENELITIAN BIOMEDIK DAN ILMU KEDOKTERAN



KEDOKTERAN | PT

ISBN 602-269-178-7



9 786022 891789

Harga P. Jawa | Rp 00.000

Penerbit **ALFABETA**

Jl. Gegerkalong Hilir Bandung

Telp. 022-2008822 Fax. 022-2020373

Mobile/sms: 081.1213.9484

e-mail: [alfabetabd@yahoo.co.id](mailto:alfabetabd@yahoo.co.id)

website: [www.cvalfabeta.com](http://www.cvalfabeta.com)

ISBN: 978-979-8433-00-0

Alfabeta 170