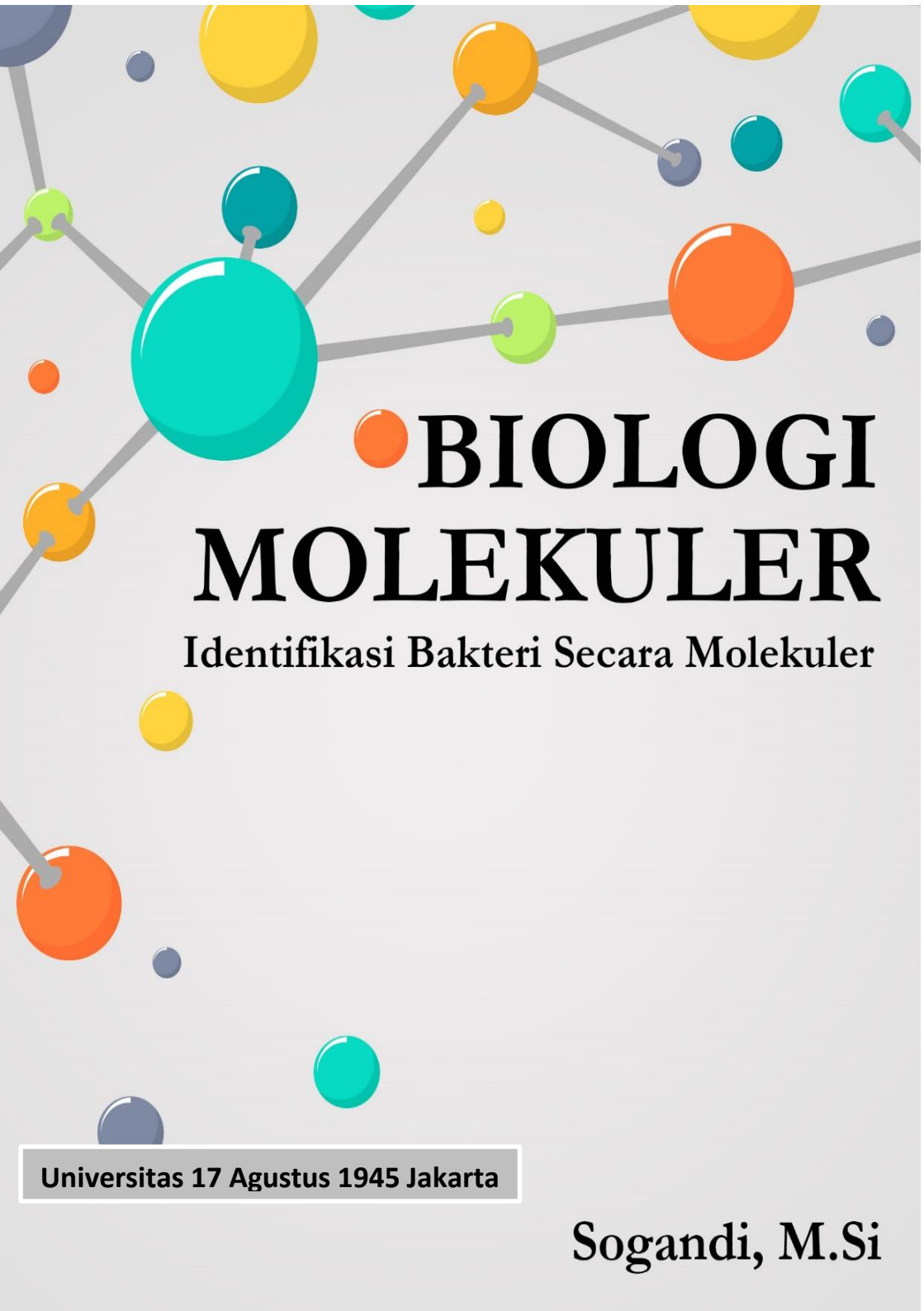


The background of the cover features an abstract molecular diagram. It consists of numerous spheres in various colors (yellow, orange, teal, light green, and grey) of different sizes, connected by thin grey lines. The spheres have a glossy, 3D appearance. The lines form a network that spans the entire cover, with some lines being thicker than others.

BIOLOGI MOLEKULER

Identifikasi Bakteri Secara Molekuler

Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta

Sogandi, M.Si

BIOLOGI MOLEKULER
IDENTIFIKASI BAKTERI SECARA
MOLEKULER

Oleh: Sogandi, M.Si

Hak Cipta © 2018, pada penulis

Dilarang memperbanyak, memperbanyak sebahagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, tanpa izin tertulis dari penerbit.

Cetakan ke -	01
Tahun	18

Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta
Jalan Sunter Permai Raya, Sunter Podomoro, Jakarta Utara
Telp.(021) 6471 5666, Fax (021) 6410287

ISBN: 978-602-53782-1-8

PENGANTAR

Panduan ini berisi teori dasar teknik PCR, prosedur, tahapan dan uraian analisis data genetika hasil sequencing untuk keperluan identifikasi bakteri secara molekuler. Program pengolahan data genetik dalam panduan ini adalah: Sequence Scanner 2.0, ChromasPro, DNA MAN 9.0 dan MEGA X.

Tujuan dari penulisan buku ini adalah memberikan panduan lengkap mulai dari tahapan paling dasar untuk mengolah data hasil sequencing mulai dari proses editing, *sequence assembly*, pensejajaran *sekuen*, analisis Blast, dan cara membuat pohon *phylogenetic*.

Program analisis data genetik lainnya juga tersedia namun tidak dijelaskan dalam panduan ini. Pembaca bebas mengembangkan dan mencoba berbagai program lain untuk menambah keahlian .

Kepada semua pihak yang telah memberikan sumbangsih dalam penyusunan buku ini diucapkan terima kasih. Semoga bermanfaat.

Penyusun,

DAFTAR ISI

Pengantar	iii
Daftar Isi	iv
 BAB I	
PENDAHULUAN	
A. Prinsip PCR.....	1
B. Pelaksanaan PCR	4
 BAB II	
OPTIMASI PCR	
A. Jenis Polimerase DNA.....	12
B. Konsentrasi dNTPs, MgCl ₂ dan polimerase DNA.....	12
C. Suhu	13
D. Buffer PCR.....	14
E. Waktu	15
 BAB III	
ANALISIS MOLEKULER	
A. Materi Genetik	17
B. <i>Sequencing</i>	19
C. Analisis Hasil <i>Sequencing</i>	20
 BAB IV	
POHON FILOGENETIK	
A. Apa itu <i>Cladogram</i> ?.....	45
B. Apa itu Pohon Filogenetik?	46
C. Konstruksi Pohon Filogenetik.....	48
 DAFTAR PUSTAKA.....	 60

BAB I

PENDAHULUAN

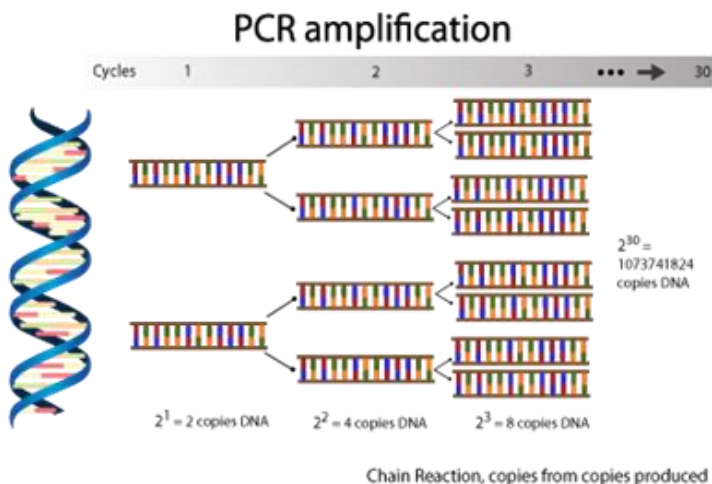
Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan diketemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekular.

A. Prinsip PCR

Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA.

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat

(annealing); (4) pemanjangan primer (extension) dan (5) pemantapan (postextension). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Tahapan proses PCR dapat dilihat pada gambar 1. dan(5) pemantapan (postextension).



Gambar 1. Proses Amplifikasi PCR

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu

untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton and Graham, 1994).

Jumlah kopi fragmen DNA target (amplicon) yang dihasilkan pada akhir siklus PCR dapat dihitung secara teoritis menurut rumus: $Y = (2^n - 2^n)X$

Y : jumlah amplicon

n : jumlah siklus

X : jumlah molekul DNA templat semula

Jika $X = 1$ dan jumlah siklus yang digunakan adalah 30, maka jumlah amplicon yang diperoleh pada akhir proses PCR adalah 1.074×10^9 . Dari fenomena ini dapat terlihat bahwa dengan menggunakan teknik PCR dimungkinkan untuk mendapatkan fragmen DNA yang diinginkan (amplicon) secara eksponensial dalam waktu relatif singkat.

Umumnya jumlah siklus yang digunakan pada proses PCR adalah 30 siklus. Penggunaan jumlah siklus lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan jumlah amplicon secara bermakna dan memungkinkan peningkatan jumlah produk yang non-target. Perlu diingat bahwa di dalam proses PCR efisiensi amplifikasi tidak terjadi 100 %, hal ini disebabkan oleh target templat terlampaui banyak, jumlah polimerase DNA terbatas dan kemungkinan terjadinya reannealing untai target.

B. Pelaksanaan PCR

Proses PCR memerlukan komponen-komponen seperti yang telah disebutkan di atas. Pada bagian ini akan dijelaskan secara rinci kegunaan dari masing-masing komponen tersebut.

1. Templat DNA

Fungsi DNA templat di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju.

Penyiapan DNA templat untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA

kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA templat tergantung dari tujuan eksperimen.

Pembuatan DNA templat dengan menggunakan metode lisis dapat digunakan secara umum, dan metode ini merupakan cara yang cepat dan sederhana untuk pendedahan DNA kromosom ataupun DNA plasmid. Prinsip metode lisis adalah merusak dinding sel tanpa harus merusak DNA yang diinginkan. Oleh karena itu kerusakan dinding sel umumnya dilakukan dengan cara memecahkan dinding sel menggunakan buffer lisis. Komposisi buffer lisis yang digunakan tergantung dari jenis sampel. Beberapa contoh buffer lisis yang biasa digunakan mempunyai komposisi sebagai berikut: 5 mM Tris-Cl pH 8,5; 0,1 mM EDTA pH 8,5; 0,5 % Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Buffer lisis ini umumnya digunakan untuk jenis sampel yang berasal dari biakan, sel-sel epitel dan sel akar rambut. Contoh lain dari buffer lisis adalah buffer lisis K yang mempunyai komposisi sebagai berikut: buffer PCR (50 mM KCl, 10-20 mM Tris-Cl dan 2,5mM MgCl₂); 0,5 % Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Buffer lisis K ini biasanya digunakan

untuk melisis sampel yang berasal dari sel darah dan virus.

Selain dengan cara lisis, penyiapan DNA templat dapat dilakukan dengan cara mengisolasi DNA kromosom ataupun DNA plasmid menurut metode standar yang tergantung dari jenis sampel asal DNA tersebut diisolasi. Metode isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid memerlukan tahapan yang lebih kompleks dibandingkan dengan penyiapan DNA dengan menggunakan metode lisis. Prinsip isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid adalah pemecahan dinding sel, yang diikuti dengan pemisahan DNA kromosom / DNA plasmid dari komponen-komponen lain. Dengan demikian akan diperoleh kualitas DNA yang lebih baik dan murni.

2. Primer

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA.

Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein

bisa didapatkan dari database GenBank. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat. Dalam melakukan perancangan primer harus dipenuhi kriteria-kriteria sebagai berikut:

a. Panjang primer

Di dalam merancang primer perlu diperhatikan panjang primer yang akan dipilih. Umumnya panjang primer berkisar antara 18 – 30 basa. Primer dengan panjang kurang dari 18 basa akan menjadikan spesifisitas primer rendah. Untuk ukuran primer yang pendek kemungkinan terjadinya mispriming (penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan) tinggi, ini akan menyebabkan berkurangnya spesifisitas dari primer tersebut yang nantinya akan berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan untuk panjang primer lebih dari 30 basa tidak akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna dan ini akan menyebabkan lebih mahal.

b. Komposisi primer.

Dalam merancang suatu primer perlu diperhatikan komposisinya. Rentetan nukleotida yang sama perlu

dihindari, hal ini dapat menurunkan spesifisitas primer yang dapat memungkinkan terjadinya mispriming di tempat lain. Kandungan (G+C)) (% jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan (G+C) DNA target. Sebab primer dengan % (G+C) rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju dengan demikian akan menurunkan efisiensi proses PCR. Selain itu, urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih toleran terhadap mismatch dari pada G atau C, dengan demikian akan dapat menurunkan spesifisitas primer.

c. Melting temperature (T_m)

Melting temperatur (T_m) adalah temperatur di mana 50 % untai ganda DNA terpisah. Pemilihan T_m suatu primer sangat penting karena T_m primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu annealing proses PCR. T_m berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. Secara teoritis T_m primer dapat dihitung dengan menggunakan rumus $[2(A+T) + 4(C+G)]$. Sebaiknya T_m primer berkisar antara 50 – 65 °C.

d. Interaksi primer-primer

Interaksi primer-primer seperti *self-homology* dan *cross-homology* harus dihindari. Demikian juga dengan

terjadinya mispriming pada daerah lain yang tidak dikehendaki, ini semua dapat menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah dan di samping itu konsentrasi primer yang digunakan menjadi berkurang selama proses karena terjadinya mispriming. Keadaan ini akan berpengaruh pada efisiensi proses PCR.

3. dNTPs (deoxynucleotide triphosphates)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai building block DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA templat. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan.

4. Buffer PCR dan $MgCl_2$

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer di sini adalah untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg^{2+} , ion tersebut

berasal dari berasal $MgCl_2$. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Dengan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Dalam proses PCR konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh pada spesifisitas dan perolehan proses. Umumnya buffer PCR sudah mengandung senyawa $MgCl_2$ yang diperlukan. Tetapi disarankan sebaiknya antara $MgCl_2$ dan buffer PCR dipisahkan supaya dapat dengan mudah dilakukan variasi konsentrasi $MgCl_2$ sesuai yang diperlukan.

5. Enzim Polimerase DNA

Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim polimerase DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur 95 °C. Aktivitas polimerase DNA bergantung dari jenisnya dan dari mana bakteri tersebut diisolasi. Sebagai contoh adalah enzim Pfu polimerase (diisolasi dari bakteri *Pyrococcus furiosus*) mempunyai aktivitas spesifik 10x lebih kuat dibandingkan aktivitas spesifik enzim Taq

polimerase (diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*). Penggunaan jenis polimerase DNA berkaitan erat dengan buffer PCR yang dipakai.

Dengan menggunakan teknik PCR, panjang fragmen DNA yang dapat diamplifikasi mencapai 35 kilo basa. Amplifikasi fragmen DNA pendek (kurang dari tiga kilo basa) relatif lebih mudah dilakukan. Untuk mengamplifikasi fragmen DNA panjang (lebih besar dari tiga kilo basa) memerlukan beberapa kondisi khusus, di antaranya adalah diperlukan polimerase DNA dengan aktivitas yang kuat dan juga buffer PCR dengan pH dan kapasitas tinggi (*High-salt buffer*).