

KOMPONEN, TAHAPAN DAN VARIASI POLIMERASE CHAIN REACTION : ARTIKEL REVIEW

Wimbuh Tri Widodo^{1*}

Progam Studi Magister Ilmu Forensik, Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga¹

*Corresponding Author : wimbuh.tri@pasca.unair.ac.id

ABSTRAK

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik perbanyakan DNA secara in vitro yang memanfaatkan enzim DNA *polymerase* termostabil. PCR memiliki peran penting dalam berbagai bidang, terutama biomedis dan forensik, karena kemampuannya dalam mendeteksi serta mengidentifikasi DNA target dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan prinsip kerja PCR, komponen utama dalam reaksi PCR, tahapan PCR, serta variasi teknik PCR yang berkembang, seperti *Real-Time PCR*, *Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)*, dan *direct PCR*. Metode yang digunakan adalah studi literatur terhadap berbagai sumber ilmiah relevan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PCR terdiri dari tiga tahap utama, yaitu denaturasi, annealing, dan elongasi, yang dilakukan secara berulang-ulang hingga menghasilkan jumlah salinan DNA yang cukup untuk dianalisis. Berbagai variasi PCR telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas dan efisiensi deteksi. *Real-Time PCR* memungkinkan kuantifikasi DNA secara akurat, *RT-PCR* memungkinkan analisis RNA melalui konversi menjadi DNA, sementara *direct PCR* menyederhanakan proses dengan menghilangkan tahap ekstraksi DNA. Aplikasi PCR sangat luas, termasuk dalam diagnostik penyakit infeksi, forensik, penelitian genetik, deteksi mutasi genetik, identifikasi mikroorganisme, dan pengujian makanan. Keunggulan PCR dalam kecepatan, ketepatan, serta kemampuannya mendeteksi DNA dalam jumlah sangat kecil menjadikannya alat yang sangat penting dalam ilmu biologi molekuler. Kesimpulannya, PCR merupakan teknik fundamental dalam biologi molekuler yang terus berkembang, memberikan kontribusi besar dalam penelitian dan aplikasi klinis.

Kata kunci : amplifikasi DNA, DNA *polymerase*, PCR, *real-time PCR*, RT-PCR

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction (PCR) is an in vitro DNA amplification technique that utilizes thermostable DNA polymerase enzymes. PCR plays a crucial role in various fields, particularly in biomedicine and forensics, due to its ability to detect and identify target DNA with high sensitivity and specificity. This study aims to explain the working principles of PCR, the main components involved in the PCR reaction, PCR stages, and the evolving PCR techniques, such as *Real-Time PCR*, *Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)*, and *direct PCR*. The method used in this study is a literature review of various relevant scientific sources. The results indicate that PCR consists of three main stages: denaturation, annealing, and elongation, which are repeated cyclically until a sufficient number of DNA copies are obtained for analysis. Various PCR variations have been developed to enhance detection sensitivity and efficiency. *Real-Time PCR* enables accurate DNA quantification, *RT-PCR* allows RNA analysis by converting it into DNA, while *direct PCR* simplifies the process by eliminating the DNA extraction step. PCR has extensive applications, including in infectious disease diagnostics, forensics, genetic research, mutation detection, microorganism identification, and food testing. Its advantages in speed, accuracy, and the ability to detect minimal amounts of DNA make it an essential tool in molecular biology. In conclusion, PCR is a fundamental technique in molecular biology that continues to evolve, significantly contributing to research and clinical applications.

Keywords : DNA amplification, DNA *polymerase*, PCR, *real-time PCR*, RT-PCR

PENDAHULUAN

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler yang memungkinkan perbanyakan fragmen DNA secara in vitro dengan menggunakan enzim DNA *polymerase* yang

bersifat termostabil (Karim, 2019; Lorenz, 2012). Teknik PCR ditemukan oleh Kary Mullis dan timnya. Berkat temuannya tersebut, Kary Mullis mendapatkan penghargaan nobel (Jäger & Weiher, 2020). Teknik ini terus mengalami perkembangan dan telah menjadi salah satu metode paling revolusioner dalam ilmu biologi dan kedokteran. PCR memungkinkan analisis DNA dalam berbagai bidang, termasuk genetika, forensik, mikrobiologi, serta diagnostik penyakit menular dan genetik (Alsharksi et al., 2024). Keunggulan PCR dibandingkan teknik lain adalah sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi, sehingga dapat mendeteksi jumlah DNA dalam jumlah yang sangat kecil dengan cepat dan akurat (Bhat & Al-Khayri, 2023).

alam bidang biomedis, PCR digunakan untuk mendeteksi patogen penyebab penyakit seperti virus, bakteri, dan jamur. Teknik ini sangat penting dalam diagnosis penyakit menular, termasuk infeksi oleh *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), Hepatitis B dan C, serta SARS-CoV-2 yang menyebabkan COVID-19 (Corman et al., 2020). Selain itu, PCR juga memiliki peran dalam forensik, terutama dalam analisis DNA untuk identifikasi individu, pemeriksaan bukti biologis, serta analisis hubungan kekerabatan dalam uji paternitas (Buckleton et al., 2018). Teknik PCR terdiri dari tiga tahap utama, yaitu denaturasi, annealing, dan elongasi, yang dilakukan dalam beberapa siklus hingga jumlah DNA yang cukup diperoleh untuk dianalisis (Green & Sambrook, 2019).

Selain PCR konvensional, berbagai variasi teknik PCR telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas dan efisiensi reaksi, di antaranya *Real-Time* PCR (qPCR) yang memungkinkan kuantifikasi DNA secara langsung, *Reverse Transcription*-PCR (RT-PCR) yang digunakan untuk menganalisis RNA dengan mengubahnya menjadi DNA, serta Direct PCR yang memungkinkan amplifikasi DNA langsung dari sampel biologis tanpa proses ekstraksi DNA (Jalali et al., 2017). Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan secara komprehensif mengenai prinsip kerja PCR, komponen utama dalam reaksi PCR, tahapan PCR, serta variasi teknik PCR yang berkembang. Selain itu, penelitian ini juga membahas berbagai aplikasi PCR dalam berbagai bidang serta inovasi teknologi yang terus dikembangkan untuk meningkatkan efisiensi dan keakuratan teknik ini (Luthra et al., 2016). Dengan semakin berkembangnya metode PCR, diharapkan teknik ini dapat terus memberikan kontribusi yang signifikan dalam ilmu pengetahuan dan kesehatan.

Dengan memahami perkembangan PCR, diharapkan para peneliti dan praktisi di bidang biologi molekuler dapat mengoptimalkan penggunaan teknik ini sesuai dengan kebutuhan masing-masing. Selain itu, artikel ini juga bertujuan untuk memberikan wawasan mengenai peran PCR dalam penelitian dan aplikasi klinis, terutama dalam menghadapi tantangan diagnostik dan forensik yang semakin kompleks.

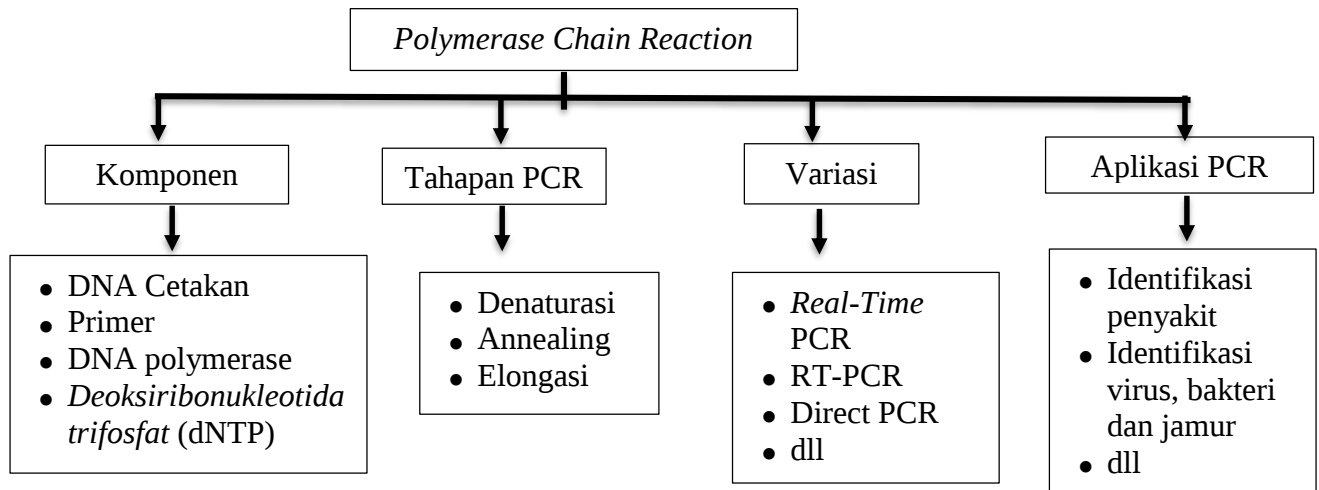
METODE

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode studi literatur atau tinjauan pustaka yang mengacu pada berbagai sumber ilmiah relevan yang dipublikasikan dalam sepuluh tahun terakhir. Sumber data yang digunakan meliputi jurnal ilmiah terindeks internasional, buku referensi biologi molekuler, serta laporan penelitian terkait teknik PCR. Pencarian literatur dilakukan melalui database ilmiah seperti PubMed, ScienceDirect, SpringerLink, dan Google Scholar dengan kata kunci *Polymerase Chain Reaction*, *PCR variations*, *Real-Time PCR*, dan *Forensic DNA Analysis*. Kriteria inklusi dalam penelitian ini mencakup artikel yang membahas prinsip dasar PCR, tahapan PCR, variasi teknik PCR, serta aplikasi PCR dalam bidang biomedis dan forensik. Artikel yang tidak relevan, tidak memiliki akses terbuka, atau tidak berasal dari jurnal bereputasi dikeluarkan dari analisis. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan berbagai metode PCR dan aplikasinya. Fokus utama analisis adalah membahas keunggulan, keterbatasan, serta perkembangan terbaru dalam teknologi PCR yang dapat meningkatkan efisiensi dan akurasi deteksi DNA. Dengan

pendekatan ini, penelitian diharapkan dapat memberikan gambaran komprehensif mengenai perkembangan dan penerapan teknik PCR dalam berbagai bidang ilmu.

HASIL

Berikut bagan ringkasan hasil yang didapatkan :



Gambar 1. Bagan Ringkasan Hasil

PEMBAHASAN

Komponen PCR

DNA Cetakan

DNA cetakan (*DNA template*) merupakan DNA yang akan diperbanyak. DNA cetakan bisa berasal dari hewan, manusia, tumbuhan, jamur, virus, bakteri maupun *complementary* DNA. DNA terletak di dalam sel, sehingga sel harus dipecah terlebih dahulu. Pemecahan tersebut dapat berupa ekstraksi DNA atau pemecahan sel secara mekanik atau kimia yang mengakibatkan sel lisis. Fosil dan kerangka manusia yang berumur ratusan tahun juga bisa digunakan sebagai DNA cetakan (Modi et al., 2021).

Primer

Primer merupakan fragmen oligonukleotida pendek yang akan menempel pada untai ganda DNA yang telah membelah. Dalam analisis PCR, digunakan sepasang primer yaitu *forward primer* dan *reverse primer*. Kedua primer tersebut mengapit fragmen DNA target, membatasi Panjang DNA yang akan diperbanyak (Green & Sambrook, 2019).

DNA Polymerase

DNA *polymerase* adalah enzim yang digunakan dalam analisis PCR. Fungsi DNA *polymerase* adalah mengkatalisis sintesis untai DNA baru dengan menambahkan nukleotida ke ujung 3' dari untai DNA yang sudah ada. Enzim tersebut menentukan dan memastikan nukleotida yang ditambahkan komplementer dengan DNA cetakan. DNA *polymerase* digunakan dalam PCR karena strukturnya stabil di suhu tinggi. Salah satu contohnya adalah Taq *polymerase* yang dihasilkan oleh bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim tersebut masih stabil di suhu 97°C (Satyanarayana et al., 2013).

Deoksiribonukleotida Trifosfat (dNTP)

Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) merupakan molekul penting dalam analisis PCR karena berperan sebagai *building block* dalam replikasi DNA. dNTP terdiri dari gula deoksiribosa, basa nitrogen (adenin (A), sitosin (S), guanin (G), atau timin (T)), serta tiga gugus fosfat. Ada empat jenis dNTP yaitu dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP. dNTP menyediakan komponen yang diperlukan oleh enzim DNA *polymerase* untuk memperpanjang untai DNA selama siklus PCR. Dalam proses PCR, DNA *polymerase* menambahkan dNTP ke ujung 3' dari untai DNA yang sedang terbentuk (Mahanama & Wilson-Davies, 2021).

Tahapan PCR

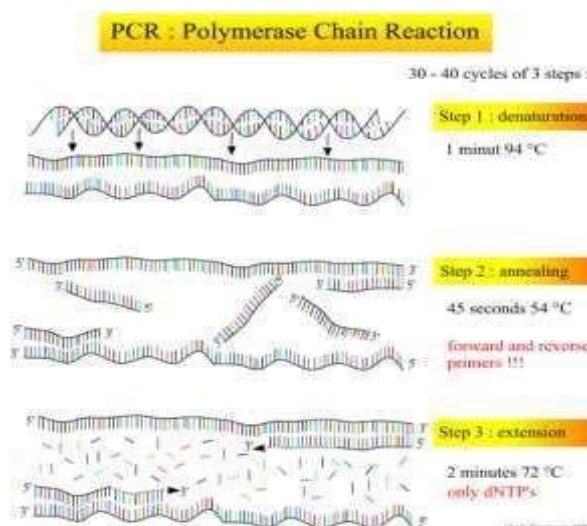
Denaturasi

Denaturasi adalah proses pemisahan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal dengan cara dipanaskan pada suhu sekitar 94°-98°C. Pemanasan tersebut memutus ikatan hidrogen yang menghubungkan basa-basa nitrogen di antara dua untai DNA sehingga primer dapat menempel pada DNA cetakan dan enzim DNA *polymerase* dapat mereplikasi DNA (Khehra et al., 2023).

Annealing

Annealing adalah tahap penempelan primer pada DNA cetakan. Dalam tahap tersebut, suhu diturunkan sekitar 50-65°C. Penempelan primer terjadi karena adanya ikatan hidrogen antara primer dengan fragmen DNA cetakan. Suhu saat annealing harus tepat sesuai perhitungan. Suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada fragmen DNA yang tidak komplementer dengan urutannya (tidak spesifik), namun jika suhu terlalu tinggi primer tidak dapat menempel pada DNA cetakan. Suhu annealing yang tepat berapa pada kisaran suhu leleh primer (T_m) primer, sehingga perlu dilakukan optimasi (Basu, 2015).

Elongasi

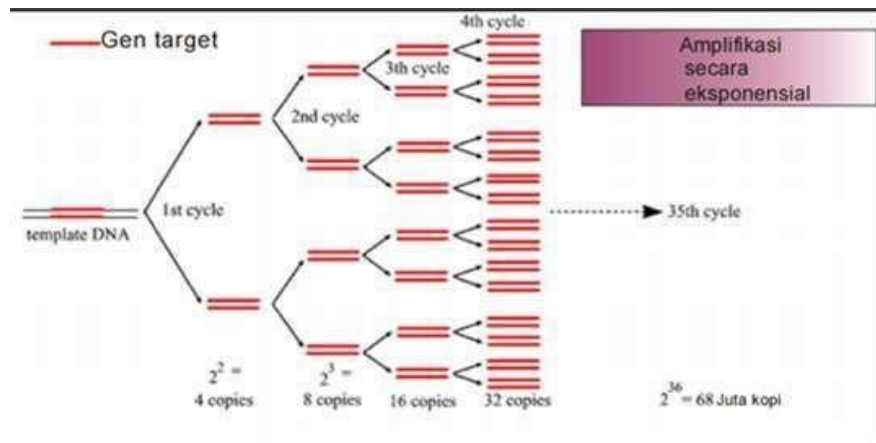


Gambar 2. Ilustrasi Tahapan PCR (Luthra et al., 2016)

Tahap elongasi dalam reaksi PCR merupakan tahapan ketika DNA *polymerase* mensintesis untai DNA baru dengan menambahkan nukleotida ke primer yang telah menempel pada *template* DNA. Tahapan tersebut biasanya berlangsung pada suhu sekitar 72°C. Selama elongasi, DNA *polymerase* memperpanjang primer dengan menambahkan dNTPs (deoxynucleotide triphosphates: dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP) yang komplementer dengan

DNA cetakan. Arah perpanjangan DNA pada PCR selalu dari arah 5' → 3' karena DNA *polymerase* hanya dapat menambahkan nukleotida pada ujung 3'-OH dari primer. Durasi elongasi bervariasi bergantung pada panjang target DNA (Gambar 1). Untuk target dengan ukuran kurang dari 1 kb diperlakukan waktu sekitar 30 hingga 60 detik (Ghannam & Varacallo, 2018).

Tahapan denaturasi, annealing, dan elongasi dilakukan berulang-ulang hingga 30 kali pengulangan (siklus). Setiap satu siklus selesai, DNA hasil PCR menjadi DNA cetakan di reaksi selanjutnya sehingga dalam 30 siklus, dihasilkan milyaran Salinan DNA (Gambar 2) (Green & Sambrook, 2019)

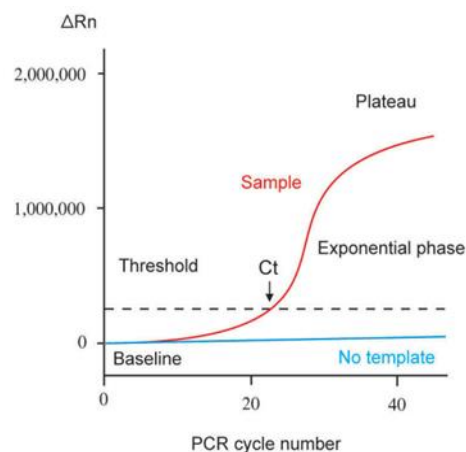


Gambar 3. DNA baru hasil PCR Meningkat Secara Eksponensial (Luthra et al., 2016).

Variasi PCR

Real-Time PCR

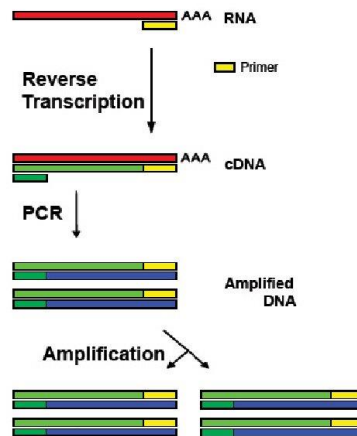
Real-time PCR atau disebut juga dengan kuantitatif (qPCR) merupakan variasi teknik PCR yang dapat mengukur jumlah produk PCR secara *real-time*, sedangkan PCR konvensional hanya mendeteksi ada tidaknya DNA. *Real-time* PCR memanfaatkan pewarna fluoresen atau probe yang memancarkan cahaya saat terikat pada DNA, intensitas cahaya tersebut sebanding dengan jumlah DNA yang diperbanyak (Gambar 3). *Real-time* PCR memiliki sensitivitas dan akurasi tinggi sehingga dimanfaatkan di berbagai bidang seperti menghitung jumlah bakteri/virus, diagnosis penyakit genetik, pengukuran ekspresi gen, dan deteksi sel kanker (Artika et al., 2022)



Gambar 4. Ilustrasi Produk *Real-Time* PCR, Intensitas Imisi Fluoresen yang Sebanding dengan Jumlah Salinan; ΔR_n : Intensitas Imisi Fluoresen, C_t : Threshold cycle (Artika et al., 2022)

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

PCR menggunakan DNA sebagai *template*. Ada golongan virus yang materi genetiknya berupa RNA yaitu retrovirus. Ketika akan dilakukan analisis, retrovirus tidak bisa langsung dijadikan sebagai *template*. RNA virus terlebih dahulu diubah menjadi DNA yang dikatalisis oleh enzim *reverse transcriptase*. Setelah itu, DNA yang dihasilkan dijadikan *template* untuk reaksi PCR (Gambar 4) (Jalali et al., 2017). Variasi PCR tersebut dikenal dengan istilah *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).



Gambar 5. Pada RT-PCR, RNA Diubah Menjadi DNA Sebelum Dijadikan Template Untuk PCR (Gollasch & Peperzak, 2013)

Direct PCR

Saat ini, DNA *template* juga diperoleh tanpa proses ekstraksi DNA, teknik tersebut disebut dengan direct PCR. Direct PCR menggunakan sampel berupa darah, air liur, buccal swab, koloni bakteri dan sampel biologis lainnya. Sampel tersebut hanya pre-treatment berupa pemanasan, penambahan protease, atau sonifikasi agar selnya lisis. Teknik sangat efektif untuk menghemat biaya dan menghemat waktu (Widodo & Huda, 2021).

Aplikasi PCR

PCR telah banyak digunakan di berbagai bidang, termasuk bidang biomedis. Sensitivitas dan spesifitas dan kecepatan analisis yang tinggi sangat bermanfaat di bidang tersebut. PCR telah sering digunakan untuk mengenali berbagai mikroorganisme penyakit infeksi virus. Beberapa patogen virus yang terdeteksi melalui PCR termasuk human papillomavirus, HIV, virus herpes simpleks, SARS-CoV-2, virus varicella-zoster, enterovirus, cytomegalovirus, dan hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, dan hepatitis E (Islam & Iqbal, 2020). Identifikasi patogen dengan *real-time* PCR membantu dokter untuk memberikan perawatan yang tepat sehingga dapat mengurangi pasien yang rawat inap atau mencegah pemberian antibiotik yang tidak tepat. *Real-time* PCR dapat untuk mendeteksi spesies bakteri, seperti spesies *Mycobacterium*, *genospora Leptospira*, spesies *klamidia*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, dan *Neisseria meningitidis*. Selain itu *real-time* PCR juga mampu mendeteksi strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik (Mackay et al., 2002).

KESIMPULAN

PCR adalah teknik yang sangat sensitif, spesifik, dan cepat untuk mendeteksi dan mengidentifikasi DNA target. Ada beberapa komponen PCR yang harus terpenuhi agar reaksi bisa berjalan, yaitu *DNA template*, *Primer*, *DNA polymerase*, *dNTP*. Teknik PCR terus berkembang sehingga muncul berbagai variasi, diantaranya adalah *Real-Time PCR*, *RT-PCR*,

Direct PCR. PCR telah banyak digunakan di berbagai bidang, termasuk bidang biomedis. PCR dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai macam patogen, termasuk virus, bakteri, dan jamur. PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi perubahan genetik yang terkait dengan penyakit. PCR adalah alat yang sangat penting untuk diagnosis, pengobatan, dan pencegahan penyakit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih diberikan kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan sehingga naskah ini bisa diselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Alsharksi, A. N., Sirekbasan, S., Gürkök-Tan, T., & Mustapha, A. (2024). *From Tradition to Innovation: Diverse Molecular Techniques in the Fight Against Infectious Diseases. Diagnostics*, 14(24), 2876.
- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). *Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. Genes*, 13(12), 2387.
- Basu, C. (2015). *PCR primer design*. Springer.
- Bhat, T. A., & Al-Khayri, J. M. (2023). *Genetic Engineering: Volume 1: Principles Mechanism, and Expression*. CRC Press.
- Buckleton, J. S., Taylor, D., & Bright, J.-A. (2018). *Parentage testing. Forensic DNA Evidence Interpretation*, 353–395.
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., & Schmidt, M. L. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 2000045.
- Ghannam, M., & Varacallo, M. (2018). *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR)*.
- Gollasch, S., & Peperzak, L. (2013). *Demonstration and feasibility of RT PCR and immune detection of human pathogens as candidate methods for compliance control and requirements for compliance control efforts*. Ballast Water Opportunity.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb-top095109.
- Islam, K. U., & Iqbal, J. (2020). An update on molecular diagnostics for COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 560616.
- Jäger, R., & Weiher, H. (2020). Polymerase chain reaction. *An Introduction to Molecular Biotechnology: Fundamentals, Methods and Applications*.
- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 1–18). Elsevier.
- Karim, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Balta, & S. Enany (Eds.), *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Khehra, N., Padda, I., & Swift, C. (2023). *Polymerase chain reaction (PCR)*. StatPearls.
- Lorenz, T. C. (2012). *Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Luthra, R., Singh, R. R., & Patel, K. P. (2016). *Clinical applications of PCR*. Springer.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). *Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292–1305.
- Mahanama, A., & Wilson-Davies, E. (2021). *Insight into PCR testing for surgeons. Surgery (Oxford)*, 39(11), 759–768.

- Modi, A., Vergata, C., Zilli, C., Vischioni, C., Vai, S., Tagliazucchi, G. M., Lari, M., Caramelli, D., & Taccioli, C. (2021). *Successful extraction of insect DNA from recent copal inclusions: limits and perspectives*. *Scientific Reports*, 11(1), 6851.
- Satyanarayana, T., Littlechild, J., & Kawarabayasi, Y. (2013). *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology*. *Biotechnol. Thermophiles*, 3.
- Widodo, W. T., & Huda, C. (2021). *Detection of Escherichia Coli Using PCR Analysis Without DNA Extraction*. *Folia Medica Indonesiana*, 57(2), 147–150.