

OPTIMASI KONSENTRASI MgCl₂ DAN SUHU ANNEALING PADA PROSES AMPLIFIKASI MULTIFRAGMENS mtDNA DENGAN METODA PCR

Mukhammad Asy'ari¹⁾ dan A. Saifuddin Noer²⁾

¹⁾ Laboratorium Biokimia jurusan Kimia FMIPA UNDIP Semarang

²⁾ Laboratorium Rekayasa Genetika PAU Bioteknologi ITB Bandung

ABSTRAK

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode amplifikasi Deoxyribonucleic acid (DNA) secara in vitro. Hingga saat ini para peneliti baru berhasil mengamplifikasi secara in vitro DNA mitokondria (mtDNA) manusia Indonesia sampai ukuran fragmen maksimal 1,6 kilobasa (kb) dan belum dilakukan untuk "banyak fragmen" (multifragments). Pada penelitian ini telah berhasil diamplifikasi multifragments DNA mitokondria manusia Indonesia berukuran 5,4 kb; 4,2 kb; 3,5 kb; 2,1 kb; 1,6 kb dengan metode PCR standar melalui optimasi konsentrasi MgCl₂ dan suhu annealing. Proses berlangsung dalam satu reaksi PCR menggunakan enzim taq polimerase, lima primer yaitu dmt-2L, dmt-1H, FL, FH dan MH pada kondisi bufer standar dengan konsentrasi MgCl₂ 2,5 mM, selama 30 siklus pada suhu denaturasi 94°C (15 detik), annealing 65°C (30 detik) dan extension 72°C (180 detik). Keberhasilan metode amplifikasi in vitro multifragments yang mengandung fragmen panjang tersebut diharapkan bisa membuat proses amplifikasi beberapa gen dalam satu genom menjadi lebih cepat dan efisien.

Kata kunci: PCR multifragments, mtDNA manusia Indonesia, optimasi PCR, MgCl₂

OPTIMIZING OF MgCl₂ CONCENTRATION AND ANNEALING TEMPERATURE ON AMPLIFICATIONS PROCESS OF mtDNA MULTIFRAGMENTS USING PCR METHODS

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction (PCR) is an in vitro amplification Deoxyribonucleic acid (DNA) method. Recently, researchers have succeeded in vitro amplification Indonesian human mitochondrial DNA (mtDNA). Size mtDNA fragment can be amplified up to 1,6 kb and multifragments amplified is rarely. In this research multifragments 5,4 kb; 4,2 kb; 3,5 kb; 2,1 kb and 1,6 kb of Indonesian mtDNA can be in vitro amplified through optimizing of MgCl₂ concentrations and annealing temperature. Multifragments were amplified in one PCR reaction using taq polymerase enzyme and five primers: dmt-2L, dmt-1H, FL, FH and MH, on standard conditions buffers with modifications of MgCl₂ concentrations become 2,5 mM. Perform 30 cycles of PCR using the following temperature profile: denaturation 94 °C (15 seconds), annealing 65°C (30 seconds) and extension 72°C (180 seconds). The result of in vitro multifragments amplifications methods included could amplified the long fragments mtDNA can contribute in amplifications of some gene in genome more quickly and efficient.

Keyword: Multifragments PCR, Indonesian human mtDNA, PCR optimizing, MgCl₂

PENDAHULUAN

Metode PCR multifragmen adalah teknik amplifikasi in vitro dari beberapa fragmen DNA pada lokus yang berbeda dalam satu reaksi PCR. Metoda ini pertama kali dikembangkan oleh Chamberlain dan telah berhasil digunakan dalam berbagai analisis DNA seperti delesi, mutasi, dan polimorfisme [Chamberlain et al., 1988].

Optimasi metode PCR multifragmen masih terus dilakukan, hal ini dikarenakan kondisi optimal

reaksi polimerisasi masing-masing fragmen DNA adalah berbeda. Variasi komponen reaksi PCR seperti: konsentrasi primer, templat DNA, dNTP, garam-garam dalam bufer (MgCl₂ dan KCl), unit DNA polimerase dan profil temperatur siklus PCR dilakukan untuk mencapai kondisi reaksi yang optimal bagi semua fragmen yang diamplifikasi [Innis & Gelfand, 1990; Becks, 1998; Cheng &

Kolmodin, 1997; Cheng et al., 1994; Barnes, 1994].

Konsentrasi ion Mg²⁺ (bentuk garam MgCl₂) dalam reaksi PCR bisa divariasikan antara 0,5-5,0 mM. Ion Mg²⁺ berperan dalam membentuk kompleks dengan dNTP sehingga dNTP menjadi semakin larut, meningkatkan aktivitas enzim DNA polimerase dan menaikkan harga T_m (melting temperature) dari untai ganda templat DNA maupun interaksi primer-templat. Konsentrasi MgCl₂ juga berpengaruh besar terhadap spesifisitas dan yield (jumlah produk) PCR. Pada umumnya jika ion Mg²⁺ kurang akan menurunkan yield, sedangkan jika ion Mg²⁺ berlebih akan menurunkan spesifisitas dan menghasilkan produk non spesifik [Newton dan Graham, 1997; Innis dan Gelfand, 1990].

Suhu annealing adalah suhu di mana primer akan menempel pada templat DNA, besarnya suhu dapat dihitung berdasarkan nilai melting temperature (T_m) dari masing-masing primer. Pencarian kondisi optimal dari suhu annealing sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitifitas produk PCR.

Berdasarkan beberapa hasil penelitian kelompok DNA mitokondria di Institut Teknologi Bandung, telah berhasil diamplifikasi secara in vitro DNA mitokondria manusia Indonesia dengan ukuran fragmen maksimal sebesar 1,6 kb menggunakan metode PCR fragmen tunggal [Puspasari, 1998; Ratnayani, 2000]. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan amplifikasi in vitro beberapa fragmen mtDNA pada lokus yang berbeda dan mengandung fragmen lebih besar dari 1,6 kb menggunakan metode PCR multifragmen melalui optimasi komponen reaksi PCR yaitu konsentrasi MgCl₂ dan suhu annealing.

METODA PENELITIAN

Dalam penelitian ini dilakukan serangkaian percobaan yang meliputi:

Preparasi Templat mtDNA

Templat mtDNA diambil dari sel-sel epitel rongga mulut, dengan metoda pengambilan sampel air kumur. Lisis sel epitel menggunakan bufer lisis 10X (500 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM EDTA pH 8,5 dan 5% Tween20) dan proteinase K 10 mg/mL [Noer et al, 1994].

Amplifikasi in vitro mtDNA dengan Metoda PCR Multifragmens

Pada penelitian ini amplifikasi in vitro multifragmens mtDNA menggunakan lima macam primer yaitu: dL , dH , FL , FH dan MH (Genset Oligos, Singapore) masing-masing 0,4 µM, 1,25 unit enzim Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, USA), dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, USA) masing-masing 0,2 mM dan bufer PCR 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl , 15 mM MgCl₂ ,pH 9,0 pada suhu kamar) penambahan ddH₂O steril hingga volume 25µL. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Tahap awal dari proses PCR adalah tahap denaturasi awal (94°C, 2 menit), kemudian masuk ke program siklus PCR di mana masing-masing siklus terdiri atas tiga tahap yaitu tahap denaturasi (94°C, 15 detik), annealing (65°C, 30 detik) dan polimerisasi (72°C, 5 menit). Pada akhir siklus dilakukan tambahan proses polimerisasi pada suhu 72 °C selama 10 menit. DNA hasil PCR disimpan pada suhu -20° C.

Konsentrasi Garam MgCl₂

Bufer PCR 1X yang digunakan sudah mengandung MgCl₂ 1,5 mM, sehingga variasi konsentrasi dilakukan dengan penambahan garam Mg yang sama dengan bufer yaitu MgCl₂.

Analisis Hasil PCR

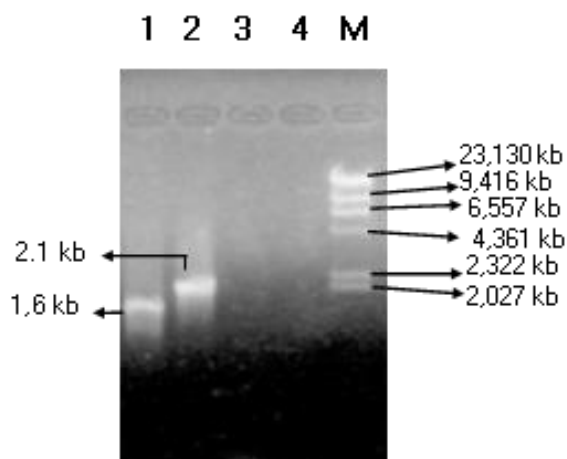
Hasil amplifikasi PCR selanjutnya dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 1 % (b/v) komposisi gel agarosa dapat dibuat dengan melarutkan agarosa dalam bufer TAE 1 x (Tris-asetat 0,04 M, EDTA 0,001 M pH 8,0). Proses elektroforesis ini dilakukan dengan menggunakan submarine elektroforesis yang diisi dengan bufer TAE 1 x sebagai media penghantar arus pada tegangan 80 volt selama 45

menit. Penampakan fragmen DNA yang berinteraksi dengan etidium bromida 10 µg/mL (sigma) pada gel agarosa dilakukan di ata sinar UV pada 254 nm. Marker atau penanda standar yang digunakan adalah λ/HindIII yang memiliki 8 pita (masing-masing berukuran 23 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 564 pb; 125 pb). Prediksi konsentrasi DNA dapat dilakukan dengan memban-dingkan ketebalan pita yang dianalisis terdapat pita-pita dari marker yang konsentrasinya telah ditentukan sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh suhu annealing

Pengaruh suhu annealing terhadap keberhasilan proses PCR dapat dilihat pada hasil percobaan (gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh suhu Annealing terhadap produk PCR

Percobaan di ata dilakukan pada kondisi PCR standar selama 30 siklus pada suhu denaturasi 94°C (1'), annealing 57°C(1'), dan ekstensi 72°C (5'). Hasil elektroforesis menunjukkan kolom 1 adalah fragmen 1,6 kb (FL dan FH), kolom 2 adalah fragmen 2,1 kb (FL dan dH), kolom 3 adalah negatif, seharusnya fragmen 4,8 kb (FL dan MH), kolom 4 negatif, seharusnya fragmen 5,4 kb (dL dan dH), dan kolom M adalah DNA marker yaitu λ/Hind III. Berdasarkan perhitungan nilai T_m dari masing-masing primer maka kondisi suhu annealing 57°C sangat tepat untuk pasangan primer FL/FH dengan T_m = 65°C (kolom 1) dan FL/dH dengan T_m = 64°C (kolom 2), sedangkan FL/M (kolom

3) dan dL/dH (kolom 4) memiliki T_m lebih rendah lagi yaitu rata-rata 60°C. Suhu annealing biasanya digunakan suhu 5°C lebih rendah dari nilai T_m nya, karena jika suhu annealing terlalu tinggi maka penempelan primer pada templat DNA akan lepas kembali sehingga produk PCR tidak terbentuk (kolom 3 dan 4), sebaliknya jika suhu annealing terlalu rendah maka akan terjadi penempelan primer pada templat DNA tidak spesifik sehingga bisa ter-bentuk produk PCR non spesifik. Ketidak-berhasilan amplifikasi fragmen 4,8 kb dan 5,4 kb pada suhu annealing 57°C juga dikarenakan lebih panjangnya produk tersebut, di mana kondisi amplifikasi fragmen-fragmen panjang perlu kondisi yang khusus. Beberapa kondisi PCR optimal telah berhasil dilakukan untuk beberapa produk dengan panjang fragmen yang berbeda diringkas dalam tabel 1.

Tabel 1. Kondisi optimal beberapa fragmen hasil PCR

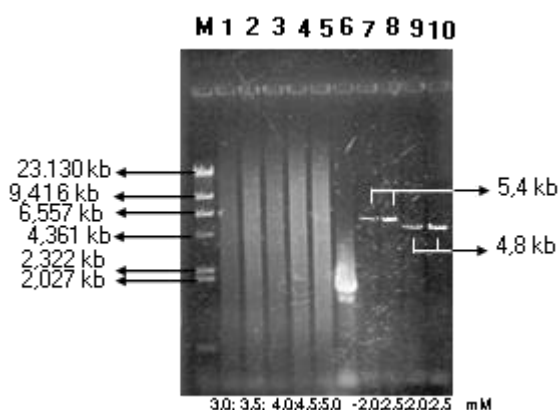
Sampel	Primer	Suhu Anealing (°C)	[Mg ²⁺] (mM)	Produk PCR
Epitel	ML	50	1,5 *	0,4 kb
Epitel	MH	55	1,5 *	1,3 kb
Epitel	XL XH	60	1,5 *	1,6 kb
Epitel	FL FH	57	1,5 *	2,1 kb
Epitel	FL dH	65	2,5 **	4,8 kb
Epitel	FL MH	65	2,5 **	5,4 kb
Epitel	dL dH dL dH FL FH MH	65	2,5 **	5,4;4,2;3,5;2,1;1,6 kb

(Keterangan: * = konsentrasi ion Mg²⁺ pada bufer PCR standar, ** = hasil optimasi ion Mg²⁺)

Hasil percobaan (seperti tercantum dalam tabel 1) menunjukkan bahwa produk PCR berukuran ≤ 2,1 kb dapat dihasilkan pada kondisi PCR standar, dengan melakukan optimasi suhu annealing dan waktu ekstensinya, sedangkan produk PCR lebih dari 2,1 kb memerlukan optimasi variabel lainnya, terutama konsentrasi ion Mg²⁺. Produk PCR berukuran 4,8 kb; 5,4 kb dan multifragmen berhasil diamplifikasi pada konsentrasi ion Mg²⁺ 2,5 mM dan suhu annealing 65°C.

Optimasi konsentrasi ion Mg^{2+}

Konsentrasi ion Mg^{2+} berpengaruh besar terhadap spesifisitas dan jumlah produk (yield) PCR. Pada umumnya jika ion Mg^{2+} kurang akan menurunkan yield, sedangkan jika ion Mg^{2+} berlebih akan menghasilkan produk non spesifik, seperti pada gambar 2.



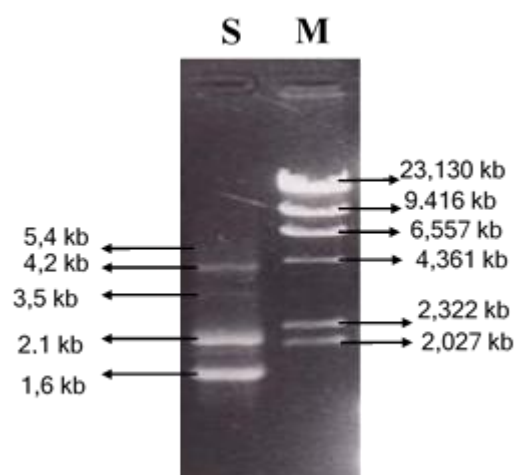
Gambar 2. Pengaruh konsentrasi ion Mg^{2+} terhadap produk PCR

Percobaan di atas dilakukan pada kondisi PCR dengan variasi konsentrasi ion Mg^{2+} (2,0-5,0 mM) selama 30 siklus pada suhu denaturasi $94^{\circ}C$ (15''), annealing $65^{\circ}C$ (30''), dan ekstensi $72^{\circ}C$ (5'). Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa kolom 1-5 adalah hasil negatif (seharusnya fragmen 5,4 kb dengan primer dL dan dH), kolom 6 adalah kontrol positif, kolom 7-8 adalah fragmen 5,4 kb dengan primer dL dan dH, kolom 9-10 adalah fragmen 4,8 kb dengan primer FL dan MH dan kolom M adalah marker DNA λ /Hind III.

Kondisi optimal PCR untuk fragmen 4,8 kb dan 5,4 kb yaitu pada konsentrasi ion Mg^{2+} 2,5 mM. Jumlah produk amplifikasi fragmen 5,4 kb dan 4,8 kb pada konsentrasi ion Mg^{2+} 2,5 mM lebih besar (pita tebal) daripada 2,0 mM (pita tipis). Sedangkan pada konsentrasi lebih besar dari 2,5 mM hasil amplifikasi fragmen 5,4 kb (kolom 1-5) menunjukkan negatif, dan terlihat pola smear yang menunjukkan adanya produk non spesifik. Konsentrasi ion Mg^{2+} yang terlalu besar menyebabkan meruahnya dNTP disekitar Taq polimerase sehingga bisa terjadi kesalahan dalam sintesis DNA baru yaitu membentuk produk yang non spesifik.

Amplifikasi in vitro "Multifragmens" mtDNA dengan metoda PCR

Amplifikasi in vitro multifragmens DNA mitokon-dria berukuran 5,4 kb; 4,2 kb; 3,5 kb; 2,1 kb;1,6 kb telah berhasil dilakukan dengan metoda PCR (gambar 3). Proses berlangsung dalam satu reaksi PCR dengan menggunakan enzim Taq polimerase, lima primer yaitu dmt-2L, dmt-1H, FL, FH dan MH pada kondisi bufer standar dan konsentrasi ion Mg^{2+} 2,5 mM selama 30 siklus pada suhu denaturasi $94^{\circ}C$ (15''), annealing $65^{\circ}C$ (30'') dan ekstensi $72^{\circ}C$ (5').



Gambar 3. Hasil PCR Multifragmens mtDNA

Keterangan (S): hasil "multifragmens" 5,4 kb; 4,2 kb; 3,5 kb; 2,1 kb dan 1,6 kb, dengan primer dL, dH, FL, FH, MH, (M): marker DNA λ /Hind III, sampel yang digunakan adalah sel epitel pada kondisi PCR teroptimasi dan siklus $94^{\circ}C$ (15''), $65^{\circ}C$ (30''), $72^{\circ}C$ (5') dengan konsentrasi ion Mg^{2+} 2,5 mM.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi $MgCl_2$ mempengaruhi keberhasilan amplifikasi in vitro mtDNA.
2. Amplifikasi mtDNA berukuran $\geq 2,1$ kb membutuhkan konsentrasi $MgCl_2$ 2,5 mM.
3. Suhu annealing tergantung pada jenis primer yang digunakan dan ukuran fragmen yang diamplifikasi.
4. Amplifikasi mtDNA berukuran $\geq 2,1$ kb berhasil dilakukan pada suhu annealing $65^{\circ}C$.

5. Telah berhasil diamplifikasi secara in vitro multifragments mtDNA manusia berukuran 5,4 kb; 4,2 kb; 3,5 kb; 2,1 kb; 1,6 kb melalui optimasi metoda PCR standar pada konsentrasi MgCl₂ 2,5 mM dan suhu annealing 65 °C.

mitokondria 10 individu Indonesia, Tesis, Bidang Khusus Biokimia, Program Studi Kimia, Program Pascasarjana, ITB, Bandung.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnes, M., Wayne. 1994, "PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates", *Pr^oC. of the Natl. Acad. of Sci. of the USA* 91: 2216-2220.
- Beck, S., 1998, "High Fidelity PCR: Enhancing the Accuracy of DNA Amplification", *The Scientist* 12[1]: 17.
- Chamberlain, J.S., R.A. Gibbs, J.E. Ranier, P.N. Nguyen and C.T. Caskey., 1988, "Deletion screening of Duchenne muscular dystrophy 1°Cus via multiplex DNA amplification", *Nucleic Acids Res.*16: 11141-11156.
- Cheng, S., and Kolmodin, L.A., 1997, XL PCR amplification of long targets from genomic DNA, *Methods in Molecular Biology: PCR Cloning Prot^oCols*, edited by Bruce A. White, 67, Humana Press, Totowa, New Jersey, page 17 – 29.
- Cheng, S., F^oCkler, C., Barnes, M.W., and Higuchi, R., 1994, "Effective amplification of long target from cloned inserts and human genomic DNA", *Pr^oC. of the Natl. Acad. of Sci. of the USA* 91: 5695-5699.
- Innis, A.M., and Gelfand, H.D., 1990, "Optimization of PCRs", *PCR Prot^oCols: A Guide to Methods and Applications*.
- Newton, C.R., and Graham,A., 1997, PCR, 2nd edition, BIOS Scientific Publisher Limited, UK.
- Noer, A.S., Martasih, F., Mulyani, S., Muktiningsih, dan Wirahadi-kusumah, M., 1994, Analisis varian urutan nukleotida D-loop mtDNA manusia dari berbagai daerah di Indonesia, *Proseeding Seminar Bersama UKM-ITB I*, halaman 201-214.
- Puspasari, F., 1998, "Substitusi Enam Nukleotida Daerah Gen ND4, ND5 DNA Mitokondria Manusia Indonesia" , Tesis, Bidang Studi Magister Kimia Kimia Program Pascasarjana, ITB, Bandung.
- Ratnayani, K., 2000, Varian normal fragmen 1,6 kb daerah gen ND4 dan ND5 DNA