

Pengaruh Suhu *Annealing* dan Konsentrasi $MgCl_2$ terhadap Spesifisitas Amplikon dengan Primer CSSM018

The Effect of Annealing Temperatures and $MgCl_2$ Concentrations on the Amplicon Specificity by Using CSSM018 Primer

Indriawati* dan Endang T. Margawati

Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI Jl. Raya Bogor Km 46 Cibinong 16911
E-mail: indro20@lipi.go.id *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) is a technique of DNA amplification which its success depends on the wider range of several factors, e.g., the annealing temperatures and $MgCl_2$ concentrations. The aim of this study was to determine the effect of annealing temperatures and $MgCl_2$ concentrations on the amplicon specificity of CSSM018 primer. Annealing temperatures of 50°C to 60°C were used in this study while $MgCl_2$ concentrations were in the range of 1.0mM to 2.5 mM. DNA genome of Garut sheep was used as DNA template. PCR products were visualized by a method of 8% ND PAGE. The findings showed that the annealing temperature of 60°C presented the most specific band of the CSSM018 primer at the right size of 116-134bp. Annealing temperatures that were less than 60°C showed the weaker and non-specific bands. A concentration of 1.25 mM $MgCl_2$ showed the best band of the CSSM018 primer with size of 116-134bp. While concentrations of 1.5; 1.75; 2.0 and 2.5 mM $MgCl_2$ showed sharper with some bands seemed noisy, those indicated non-specific products. This study suggests that annealing temperature of 60°C and $MgCl_2$ concentration of 1.25 mM resulted specific amplicon for CSSM018 primer.

Key words: Annealing temperatures, $MgCl_2$ Concentrations, CSSM018 primer

Diterima: 26 November 2008, disetujui: 04 Maret 2009

Pendahuluan

Keberadaan teknologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu kemajuan terpenting dalam bidang molekuler. Hal ini dikarenakan melalui proses PCR dapat diaplikasikan manfaatnya ke banyak keperluan. Sebagai contoh, PCR dapat digunakan untuk diagnosis suatu penyakit, studi biodiversitas dan keperluan penelitian lainnya. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah proses amplifikasi suatu potongan DNA target tertentu dengan bantuan enzim polimerase yang berasal dari *Thermus aquaticus* (*Taq*) atau semua enzim yang stabil pada suhu tinggi yang biasa disebut *Thermo stable Polymerase* dan

nukleotida serta sepasang primer yang spesifik (Guyer dan Koshland, 1989).

Dalam aplikasinya proses PCR perlu dioptimalkan mengingat hasil PCR tidak selalu menghasilkan DNA target murni yang ditunjukkan dengan adanya pita yang jelas. Pada kenyataannya, masing-masing komponen pereaksi PCR berkaitan satu dengan lain yang berpengaruh terhadap hasil PCR (amplikon), oleh karena itu perlu dioptimasi.

Menurut Saiki (1989) terdapat beberapa faktor yang berpengaruh terhadap hasil PCR. Faktor tersebut diantaranya adalah suhu *annealing* dan konsentrasi $MgCl_2$. Suhu *annealing* berpengaruh terhadap penempelan primer pada cetakan DNA, karena hal ini menentukan terjadinya awal sintesis DNA. Selain itu pencarian suhu *annealing* yang tepat

juga berkaitan dengan perbandingan persentase GC (%) dari primer (Kramer dan Coen, 2001). Komponen Magnesium (Mg^{2+}) berpengaruh pada suhu *annealing* (Khosravinia dan Ramesha, 2007). Magnesium juga berperan dalam berbagai proses penggabungan yang terbentuk selama proses siklus PCR. Misalnya penggabungan primer dengan *template*, *template* dengan *template*, dan primer dengan primer.

Menurut Khosravinia dan Ramesha (2007) konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh nyata pada efisiensi dan spesifisitas reaksi PCR. Konsentrasi $MgCl_2$ juga berpengaruh langsung pada aktivitas *Taq polymerase* atau enzim lain dari *Thermo stable Polymerase*. Pada proses PCR, *Taq polymerase* diperlukan dalam proses sintesis DNA (*extension*). Apabila enzim *Taq* ini habis, maka proses sintesis DNA akan berhenti. Pada protokol FLS (2006) disebutkan bahwa konsentrasi Mg^{2+} yang digunakan sangat berpengaruh terhadap kualitas produk PCR.

Basa primer merupakan salah satu komponen pereaksi yang berperan dalam proses PCR. Panjang-pendeknya dan komposisi basa primer berpengaruh terhadap ketepatan suhu *annealing* dan secara tidak langsung berpengaruh terhadap kualitas produk PCR (Innis dan Gelfand, 1990). Disarankan oleh Kramer dan Coen (2001) bahwa dalam pembuatan primer (*design primer*), panjang basa primer yang ideal yaitu antara 20-30 basa. Setiap primer memiliki kondisi optimal PCR yang spesifik. Kondisi ini akan bisa dicapai dengan pengaturan suhu *annealing* yang tepat. Pada penelitian ini digunakan primer CSSM018. Menurut Moore *et al.*, (1994) bahwa primer CSSM018 diketahui sulit untuk diamplifikasi. Primer CSSM018 merupakan primer yang diduga sebagai kandidat *Marker Assisted Selection* (MAS) untuk gen *Carwell* yang mengkode sifat pertumbuhan domba dan sapi (Nicoll *et al.*, 1998).

Berdasarkan permasalahan yang diuraikan di atas, maka penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui suhu *annealing* dan konsentrasi akhir $MgCl_2$ yang optimal. Diharapkan hasil penelitian ini bermanfaat untuk penelitian lanjutan yang berhubungan dengan proses PCR.

Metode Penelitian

Koleksi Darah dan DNA

DNA dikoleksi dari 5 ml darah segar domba Garut menggunakan metode NaCl pekat (Montgomery dan Sise, 1990) yang telah dimodifikasi. DNA yang diperoleh dilarutkan dalam dH₂O dan dihomogenkan. DNA, selanjutnya dikuantifikasi dengan *Genequant*.

Kuantifikasi

Sebelum dikuantifikasi, DNA diencerkan dengan larutan TE terlebih dahulu sebanyak 10 kali. DNA dikuantifikasi dengan mesin *Genequant* yang secara otomatis akan menghitung konsentrasi DNA dalam satuan $\mu g/ml$. Nilai konsentrasi DNA yang didapat dikalikan dengan faktor pengenceran (10x). Sebagai cetakan untuk PCR (*DNA template*), maka konsentrasi kerja DNA dibuat menjadi 50 ng/ul.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Komposisi pereaksi PCR adalah sebagai berikut: DNA *Template* 50ng/ul, 10pmol Primer CSSM018R F(3'TGTGCATAATTTGT GTCCGTCCGGA5') dan Primer CSSM018 R (5'AGGAATTCCCTCTAGAAAAGCAGGC3'). Reagen PCR yang digunakan adalah *PCR Core Kit* (Roche) yang terdiri dari 10x PCR Buffer, 25 mM $MgCl_2$ (stock), 10mM dNTP, 5Unit *Taq Polymerase*. Program PCR yang digunakan adalah pemanasan atau denaturasi awal 95°C selama 3 min sebanyak 1 siklus; (denaturasi 95°C selama 45 detik; *annealing* diamati dari 50°C sampai dengan 60°C masing-masing 1 menit dan *Extension* 72°C selama 1 menit) dilakukan sebanyak 30 siklus, *Extension* akhir 72°C selama 4 menit dan dibiarkan pada kondisi *stand-by* 4°C.

Optimasi produk PCR dilakukan secara bertahap. Pertama mengoptimalkan suhu *annealing*, kemudian optimalisasi konsentrasi $MgCl_2$ pada suhu *annealing* optimal. Suhu *annealing* yang diamati yaitu mulai dari 50,4; 51,8; 53,3; 54,7; 56,1; 57,6; 58,9; 59,7 dan 60,0°C, sedangkan konsentrasi $MgCl_2$ yang diamati yaitu 2,5; 2,0; 1,75; 1,25; 1,5 dan 1,0mM. Mesin PCR digunakan yaitu PCR *gradient thermal cycler*.

Elektrophoresis

PCR diamati dengan visualisasi produk PCR pada gel elektrophoresis dengan menggunakan metode 8% *Non-Denaturing PAGE* (ND-PAGE). *Running Buffer* yang digunakan adalah 1XTBE, dialiri listrik 5mA selama 120 menit. Hasil *running* ND-PAGE diwarnai diwarnai (*staining*) dengan larutan 1µg/ml *Ethidium Bromide* selama 1 jam. ND-PAGE yang telah distaining kemudian difoto dibawah sinar ultraviolet. Pita yang muncul kemudian dianalisis.

Hasil dan Pembahasan

Suhu *Annealing*

Penelitian dengan berbagai variasi suhu *annealing* yang dicobakan ternyata suhu *annealing* 60°C menghasilkan pita target tunggal yang jelas sesuai dengan ukuran primer CSSM018, yaitu 116-134pb. Sedangkan pada suhu *annealing* di bawah 60°C menghasilkan pita target yang tipis dan pita lain yang tidak spesifik atau diistilahkan *noisy*, hasil elektrophoresis dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada Gambar 1, terlihat bahwa suhu *annealing* berpengaruh terhadap ampikon primer CSSM018. Primer CSSM018 memiliki persentase GC yang rendah yaitu kurang dari 48%. Persentase GC yang rendah untuk primer CSSM018, ternyata sesuai dengan saran Kramer and Coen (2001) yang menyatakan sebaiknya kandungan GC primer kurang dari 50%. Lebih lanjut dikatakan bahwa persentase GC yang rendah memerlukan suhu *annealing* yang relatif rendah agar primer dapat menempel dengan sempurna. Namun demikian juga dapat berefek meningkatkan produk yang tidak spesifik. Suhu *annealing* optimal 60°C yang dicapai pada penelitian ini, nampaknya tidak sesuai dengan pernyataan Kramer dan Coen (2001). Hal ini dibuktikan pada penelitian CSSM018 sebelumnya tidak pernah

menghasilkan pita yang spesifik dan tebal (*unpublished*).

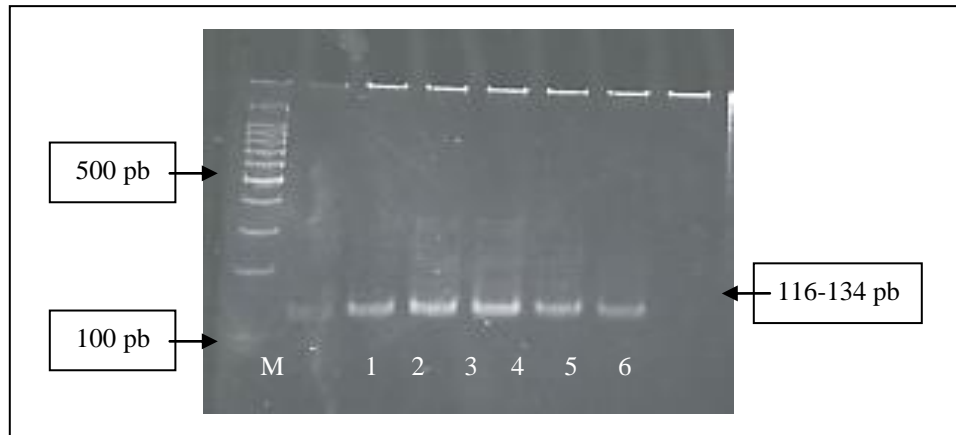
Konsentrasi MgCl₂

Berdasarkan hasil pengamatan pada berbagai konsentrasi MgCl₂, ternyata dihasilkan pita target sesuai untuk primer CSSM018 (116-134pb) pada semua konsentrasi MgCl₂ yang dicobakan, kecuali pada konsentrasi paling rendah 1,0 mM (Gambar 2).

Gambar 2 terlihat bahwa meskipun semua konsentrasi menghasilkan pita target sesuai ukuran (116-134 pb), namun pada konsentrasi MgCl₂ 1,25 mM diperoleh pita target tunggal tanpa diikuti pita lainnya (pada Sumur 5). Sementara pada konsentrasi 2,5 dan 1,5mM menunjukkan selain pita target juga terdapat pita tipis yang tidak spesifik seperti terlihat pada Sumur 1 dan 4. Demikian juga dengan konsentrasi 2,0 dan 1,75 mM, selain ampikon target muncul lebih tebal dibandingkan dengan kedua konsentrasi yang lain (Sumur 1 dan 4), juga muncul pita tidak spesifik (Sumur 2 dan 3). Konsentrasi MgCl₂ rendah (1,0mM) tidak menunjukkan adanya ampikon (Sumur 6), hal ini kemungkinan primer tidak mampu menempel pada konsentrasi MgCl₂ rendah. Oleh karena itu pada penelitian ini, konsentrasi MgCl₂ yang paling optimal atau ideal untuk primer CSSM018 adalah pada konsentrasi 1,25 mM yang dibuktikan dengan munculnya pita tunggal. Pada konsentrasi MgCl₂ 1,25 mM, diperkirakan DNA terdenaturasi secara sempurna dengan demikian primer dapat menempel tepat pada *template* dan menghasilkan ampikon dengan pita tunggal. Pendapat ini dipertegas dengan pernyataan William (1989) bahwa konsentrasi Mg²⁺ terlalu rendah berakibat primer akan sulit bahkan tidak menempel pada DNA target. Menurut Vernon (2001) jika konsentrasi Mg²⁺ terlalu tinggi akan menghasilkan ampikon yang lebih besar (*higher yield*), sehingga sering dihasilkan pita berukuran tinggi yang tidak spesifik.



Gambar 1. Amplikon dengan primer CSSM018 pada berbagai suhu *annealing*.
Keterangan: M = DNA ladder 100pb; Sumur 1-9 = suhu *annealing* masing-masing 50,4; 51,8; 53,3; 54,7; 56,1; 57,6; 58,9; 59,7 dan 60,0°C.



Gambar 2. Amplikon dengan primer CSSM018 pada berbagai konsentrasi $MgCl_2$.
Keterangan: M= DNA ladder 100 pb; Sumur 1-6 = konsentrasi $MgCl_2$ masing-masing 2,5; 2,0; 1,75; 1,25; 1,5 dan 1,0 mM.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa suhu *annealing* yang optimal untuk penempelan primer CSSM018 pada *template* DNA adalah pada suhu 60,0°C selama 1 menit. Sedangkan konsentrasi $MgCl_2$ yang optimal untuk primer CSSM018 adalah 1,25 mM.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian dari program penelitian Insentif, RISTEK 2007. Penulis mengucapkan terima kasih kepada

Handrie, M. Ridwan dan N. Hasanah atas bantuannya dalam pengambilan sampel darah di lapangan dan kegiatan di laboratorium selama penelitian berlangsung.

Daftar Pustaka

- FLS-Fermentas Life Science. 2006. *Protocol for PCR with Taq DNA Polymerase*. In: <http://www.fermentas.com/techninfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>. 10/25/2008.
- Guyer, R.L. and Koshland, D.E. 1989. The Molecule of The Year. *Science* 246: 1543-1546.

- Innis, M.A. and Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. pp. 3 - 12. Academic Press, Inc. New York.
- Khosravinia, H. and Ramesha, K.P. 2007. Influence of EDTA and Magnesium on DNA Extraction from Blood Samples and Specificity of Polymerase Chain Reaction. *African J. of Biotechnology* 6 (3): 184-187.
- Kramer, M.F. and Coen, D.M. 2001. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (Eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*, pp.15.1.1-15.1.15. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Montgomery, G.W. and Sise, J.A. 1990. Extraction of DNA from Sheep White Blood Cells. *New Zealand J. of Agricultural Research* 33: 437-441.
- Moore, S.S., Byrne, K., Berger, K.T., Barendse, W., MacCarthy, F., Wormack, J.E. and Hetzel, D. 1994. Characterization of 65 Bovine Microsatellites. *Mammalian Genome* 5: 84-90.
- Nicoll, G.B., Burkin, H.R., Broad, T.E., Jopson, N.B., Greer, G.J., Bain, W.E., Wright, C.S., Dodds, K.G., Fennessy, P.F. and McEwan, J.C. 1998. Genetic Linkage of Microsatellite Markers to The *Carwell* Locus for Rib-eye Muscling in Sheep. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetic Application of Livestock Production*, University of New England, Armidale, NSW, Australia, January 11-16.
- Saiki, R.K. 1989. The Design and Optimization of The PCR. In: Erlich, H.A. (Eds.). *PCR Technology: Principles and Application for DNA amplification*, pp.7-16. Stockton Press. New York.
- Vernon, E.C., James, M.D., Reid, S.J. and Rybicki, E. 2001. Standard PCR Protocol. In: *Molecular Biology Techniques Manual* (3rd Edition), <http://www.mcb.uct.ac.za/pcrcond.htm>.10/20/2008.
- Williams, J.F. 1989. Optimization Strategies for The Polymerase Chain Reaction. *Biotechniques* 7 (7): 762-768.