

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Kuantitas DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah dengan Spektrofotometer

Pengujian kualitas DNA udang jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer, kemurnian DNA dilihat dari rasio $A_{260/280}$. Rata-rata kemurnian (R) DNA yang diperoleh dari hasil penelitian ini berkisar antara 1,65-2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Sambrook dan Ruslle (2001) mengatakan bahwa hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio $A_{260/280}$ antara 1,8 hingga 2,0. Jika nilai rasio $A_{260/280}$ melebihi 2,0 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan dari protein membran atau senyawa lainnya dan kadar DNA yang didapat belum murni. Sedangkan, jika nilai rasio $A_{260/280}$ kurang dari 1,8 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak sedangkan DNA yang diambil terlalu sedikit.

Tabel 4.1 Tingkat kemurnian DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) hasil tangkapan dari Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah dengan Spektrofotometer.

Sampel	$A_{260}:A_{280}$ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Keterangan
1	1,81	DNA murni
2	2,07	Kontaminasi protein atau senyawa lain
3	1,65	Kontaminasi fenol dan DNA terlalu sedikit
4	1,76	Kontaminasi fenol dan DNA terlalu sedikit
5	1,87	DNA murni

Berdasarkan hasil pengukuran tingkat kemurnian DNA pada Tabel 4.1 di atas menunjukkan bahwa dari 5 sampel yang diuji, terdapat 2 sampel yang menghasilkan DNA murni dengan nilai rasio $A_{260/280}$ berkisar antara 1,65 – 2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan 3 sampel menghasilkan DNA yang masih mengandung kontaminan. Sampel-sampel yang menghasilkan DNA murni yakni pada sampel 1 (1,81 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dan sampel 5 (1,87 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), sedangkan sampel-sampel yang masih mengandung kontaminan yakni pada sampel 2 (2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 3 (1,65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), sampel 4 (1,76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Sampel 2 memiliki nilai rasio $A_{260/280}$ lebih besar dari 2,0 yang mengindikasikan sampel telah terkontaminasi protein atau senyawa lain sedangkan sampel 3 dan 4 memiliki nilai rasio $A_{260/280}$ lebih kecil dari 1,8 yang mengindikasikan sampel telah terkontaminasi dengan fenol dan memiliki DNA yang terlalu sedikit.

Pemurnian DNA yang dilakukan dengan penambahan isopropanol dan etanol berfungsi untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang dapat mengkontaminasi DNA antaralain protein. Eknath *et al.*, (1991) dalam Wahyudi (2007) menjelaskan bahwa campuran fenol-kloroform akan mendenaturasi protein tanpa mengikutsertakan asam nukleat. Fenol menyebabkan protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi yang selanjutnya dapat dipisahkan dari DNA melalui sentrifugasi. Proses sentrifugasi akan membentuk 2 fase yang terpisah yakni fase organik pada lapisan bawah dan fase aquoeus (air) pada lapisan atas. Sedangkan DNA dan RNA akan berada pada fase aquoeus setelah sentrifugasi, protein yang terdenaturasi akan berada pada interfase dan lipid akan berada pada fase organik. Untuk memurnikan DNA diperlukan ketelitian dalam penggunaan isopropanol. Hal ini dikarenakan tidak terpisahnya fase organik dan

fase aqueous saat penambahan isopropanol dalam pemurnian DNA akan menyebabkan DNA menjadi terkontaminasi. Oleh karena itu, pada sampel 2, 3 dan 4 karena terkontaminasi oleh isopropanol dan protein menyebabkan nilai kuantitas DNA genom rendah.

Ketelitian dalam sebuah penelitian, mengingatkan kita dalam salah satu surat Al Qur'an, sebagaimana firman Allah SWT surat Al-Hujuraat (49) ayat 6:

يَأَيُّهَا الَّذِينَ ءَامَنُوا إِن جَاءَكُمْ فَاسِقٌ بِنَبَأٍ فَتَبَيَّنُوا أَن تُصِيبُوا قَوْمًا بِجَهْلَةٍ فَتُصِبْحُوا عَلَىٰ مَا فَعَلْتُمْ نَادِمِينَ ﴿٦﴾

Artinya: "Hai orang-orang yang beriman, jika datang kepadamu orang fasik membawa suatu berita, maka periksalah dengan teliti agar kamu tidak menimpakan suatu musibah kepada suatu kaum tanpa mengetahui keadaannya yang menyebabkan kamu menyesal atas perbuatanmu itu."

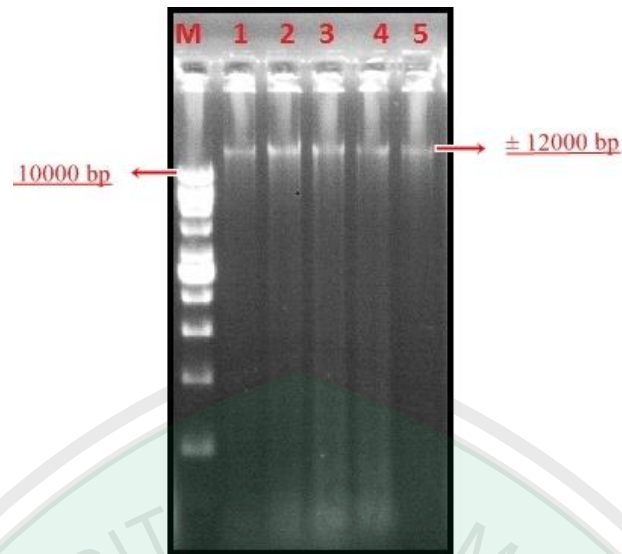
Berdasarkan ayat tersebut, kata "فَتَبَيَّنُوا" memiliki arti bahwa manusia sebagai makhluk ciptaan Allah SWT yang diberikan akal dan fikiran maka periksalah dengan teliti agar kamu tidak menimpakan suatu musibah kepada suatu kaum tanpa mengetahui keadaannya yang menyebabkan kamu menyesal atas perbuatanmu, bahwasanya adab dalam menerima berita adalah dengan *tabayyun* yaitu klarifikasi atas berita tersebut agar adanya kejelasan berita keakuratan kebenarannya sebab berita dan fakta terkadang berbeda (al Qurthubi, 2009). Oleh karena itu, ketelitian dalam menerima berita sangat diperlukan dalam memahami setiap kejadian yang terjadi di bumi ini. Proses ketelitian dan pemahaman yang tajam dan akurat tersebut juga sangat diperlukan dalam sebuah penelitian sehingga akan mendapatkan hasil yang maksimal.

Salah satu penyebab sedikitnya DNA yang terekstraksi dan kemurnian yang tidak mendekati 100% diduga adalah dari aspek teknis pelaksanaan dari

setiap tahap yang dilakukan seperti halnya dalam pemisahan supernatan dengan endapannya pada tahap penghilangan sisa protein dan bahan lain dalam sel yang kemungkinan terlalu sedikit yang terambil sehingga DNA berbobot berat tidak terambil dan jumlah DNA yang terambil pun menjadi sedikit. Pengeringan alkohol yang kurang sempurna juga memungkinkan terjadinya kontaminasi yang dapat memberikan efek pada penghitungan DNA dengan spektrofotometer (Fatchiyah *et al.*, 2011). Nilai kuantitas DNA total yang tidak merata ini diduga karena perlakuan sampel organ kaki jalan dan ekor yang kurang optimal selama penyimpanan dan pada saat proses ekstraksi. Hal ini dapat memberikan pengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi.

4.2 Karakter Genetik DNA Genom Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah

Karakter genetik merupakan karakter yang disimpan sebagai informasi genetik dalam gen-gen yang secara molekular tersusun atas asam nukleat DNA. DNA tersusun atas urutan basa nukleotida yakni adenin, timin, sitosin dan guanin (Fatchiyah *et al.*, 2011). Hasil isolasi sampel DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) hasil tangkapan dari Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah pada penelitian ini telah dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis gel agarose dengan konsentrasi gel 0,8% (Mandayasa, 2007). Hasil karakter genetik udang jari (*Metapenaeus elegans*) dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Elektrofogram hasil ekstraksi DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) dengan menggunakan metode Elektroforesis gel Agarose. Keterangan : M (marker 1Kb) ; 1, 2, 3, 4, 5 (nomor sampel)

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan pada ekstraksi 5 sampel yang diambil dari kaki jalan dan ekor udang jari (*Metapenaeus elegans*) hasil tangkapan dari Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah menggunakan metode elektroforesis gel Agarose 0,8% (Gambar 4.1), terletak pada ukuran yang sama yaitu 12000 bp dan ketebalan pita DNA yang terbentuk akan menunjukkan kualitas karakter genetik dari sampel yang dianalisis.

Pada sumur 1 (sampel dari individu 1) dan sumur 5 (sampel dari individu 5) terlihat pita DNA yang terbentuk tipis dan mengumpul (tidak menyebar), sumur 2 (sampel dari individu 2), sumur 3 (sampel dari individu 3) dan sumur 4 (sampel dari individu 4) terlihat pita DNA yang terbentuk tebal dan mengumpul (tidak menyebar). Tingkat ketebalan pita DNA ditentukan dari kemurnian atau proses ekstraksi yang kurang tepat pada sampel yang diamati, sehingga menyebabkan sampel tersebut tidak memiliki kualitas yang bagus. Ketebalan pita DNA total udang jari yang paling bagus terdapat pada sampel 2, 3 dan 4.

Sedangkan ketebalan pita DNA total udang jari yang kurang bagus terdapat pada sampel 1 dan 5. Kualitas DNA total akan sangat berpengaruh terhadap analisis karakter genetik selanjutnya.

Pada penelitian ini proses ekstraksi dilakukan melibatkan senyawa-senyawa kimia yang dapat membantu proses pemisahan DNA dari berbagai komponen sel lain. Larutan lisis digunakan untuk mempercepat penghancuran organ kaki jalan dan ekor. Sedangkan isopropanol dan etanol digunakan untuk memaksimalkan hasil isolat DNA. Menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa proses pengeluaran DNA dari nukleus maupun mitokondria dengan cara diekstraksi atau dilisiskan, biasanya dilakukan dengan homogenisasi penambahan buffer lisis untuk membantu mencegah DNA rusak dan proteinase K untuk pemurnian DNA dari kontaminan protein.

Menurut Irmawati (2003) mengatakan bahwa pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pipetan, pada saat dibolak-balik dalam *ependorf*, disentrifus, atau bahkan karena temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu.

DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang berukuran sekitar 12000 bp menunjukkan materi genetik (DNA inti dan DNA mitokondria) yang terdapat di dalam udang jari (*Metapenaeus elegans*). DNA inti (nukleus) berperan

sebagai materi genetik yang diwariskan dari kedua orang tua dan mengatur segala sel. Sedangkan DNA mitokondria berperan menyandi kompleks protein tertentu yang sangat diperlukan untuk produksi ATP dalam tubuh (Susminarsih, 2010). Ukuran DNA total pada udang jari (*Metapenaeus elegans*) berukuran 12000 bp lebih rendah dibandingkan dengan ukuran DNA total pada udang yang lain, seperti udang galah dan udang vanname. Pada udang galah (*Marchobranchium rosenbergii*) memiliki DNA total dengan ukuran lebih dari 15.000 bp (Mandayasa, 2007), udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) memiliki DNA total dengan ukuran 10.000-13.000 bp (Annisa, 2008).

Ukuran panjang basa pada udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang didapatkan dari hasil penelitian ini sesungguhnya telah dijelaskan dalam surat Al-Qomar (54) ayat 49 yang berbunyi:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٥٩﴾

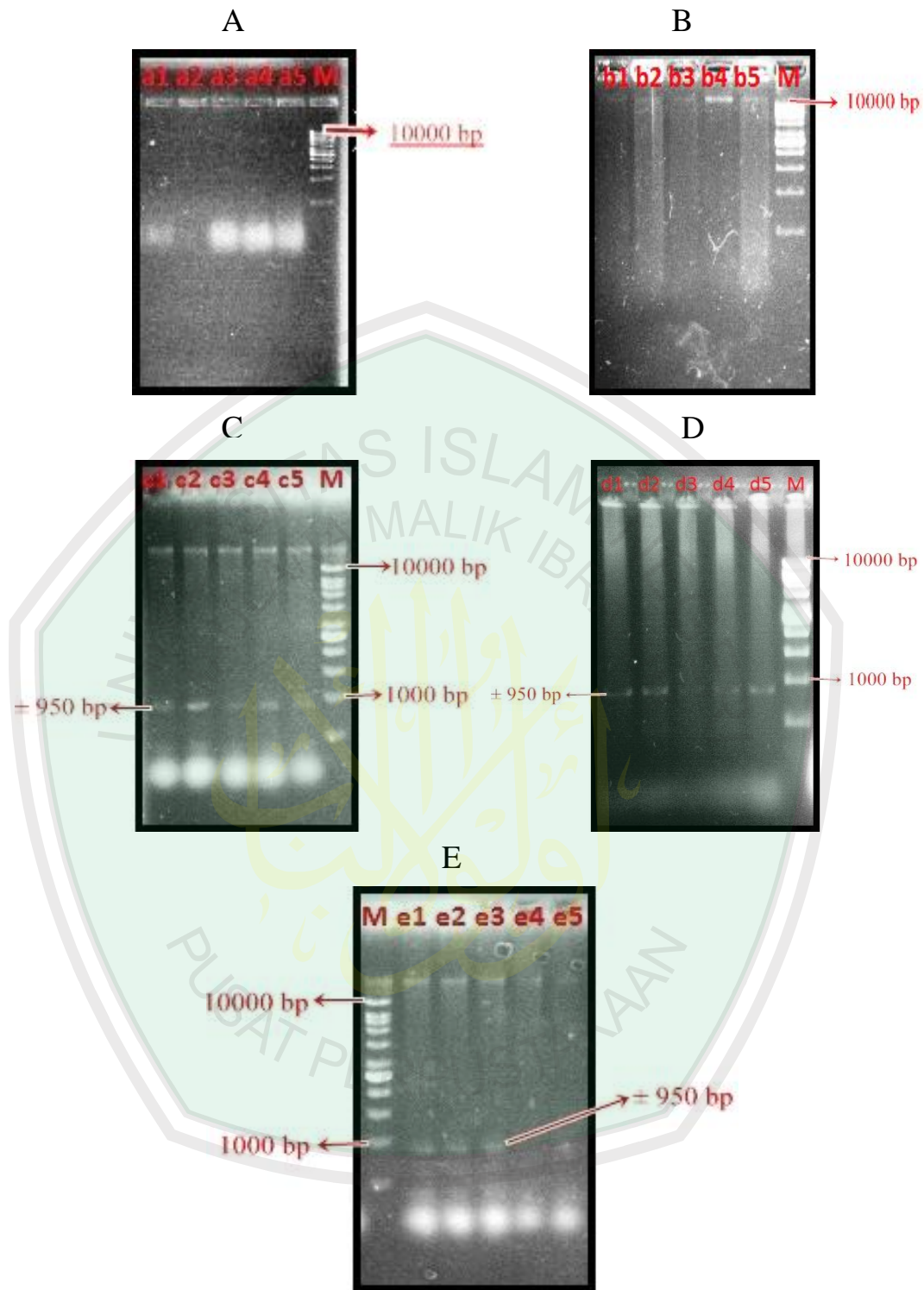
Artinya: “Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran”

Ayat di atas memiliki arti bahwa segala sesuatu itu sumbernya dari Allah SWT dan menurut ukurannya masing-masing (Shihab, 2002). Begitu pula dengan ukuran panjang basa yang dimiliki udang jari (*Metapenaeus elegans*) dengan panjang basa tertentu. Pada penelitian ini diketahui ukuran panjang basa yang dimiliki udang jari (*Metapenaeus elegans*) adalah 12000 bp.

4.3 Optimasi Amplifikasi PCR DNA daerah kotrol DNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah menggunakan primer COIL dan COIH.

PCR atau reaksi polimerase berantai merupakan cara untuk mengamplifikasi (melipat gandakan) suatu fragmen DNA secara *in vitro* dengan menggunakan suatu primer tertentu (Taylor *et al.*, 1995). Produk PCR yang akan diamplifikasi berasal dari hasil ekstraksi DNA total dan telah memiliki nilai kuantitas DNA total yang berasal dari pengamatan spektrofotometer. Pada penelitian ini amplifikasi PCR mtDNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) menggunakan primer COIL (5'-TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA-3') dan COIH (5'-ATA TTA GCC ATT GGT GTC TTA-3'). Primer COIL mempunyai 20 panjang basa, sedangkan primer COIH mempunyai 21 panjang basa (Williams dan Benzie, 1997). Primer COI (Cytochrome *c* oxydase subunit I) merupakan primer universal yang digunakan untuk amplifikasi fragmen gen mitokondria pada daerah sitokrom *c* oksidase yang berperan sebagai gen penyandi protein dalam genom mitokondria hewan (Folmer *et al.*, 1994).

Keberhasilan amplifikasi fragmen DNA dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu DNA template, primer, *buffer* PCR, MgCl₂, enzim polimerase, suhu, waktu dan jumlah siklus (Sambrook dan Russell, 2001). Optimasi PCR perlu dilakukan terlebih dahulu untuk mendapatkan kondisi PCR yang tepat sehingga dihasilkan produk PCR yang spesifik. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer COIL dan COIH dengan berbagai suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dengan jumlah siklus sebanyak 35, yang dideteksi dengan elektroforesis dalam gel agarose konsentrasi 0,8% dapat dilihat pada Gambar 4.2, elektroforegram yang didapat kemudian dibandingkan antar perlakuan.



Gambar 4.2 Elektroforegram hasil PCR dari ekstraksi DNA genom udang jari (*Metapanaeus elegans*) dengan Primer COIL dan COIH. Keterangan : M (marker); A (suhu *annealing* 41°C), B (suhu *annealing* 42°C), C (suhu *annealing* 43°C), D (suhu *annealing* 44°C), E (suhu *annealing* 45°C); nomor sampel (a1-5, b1-5, c1-5, d1-5, e1-5)

Gambar A dengan suhu *annealing* 41°C dan B dengan suhu *annealing* 42°C tidak terbentuk pita, hal ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* ini kurang sesuai dengan primer yang diberikan sehingga proses amplifikasi PCR tidak berhasil dilakukan disebabkan oleh terlalu rendah suhu *annealing* sehingga proses penempelan primer menjadi sulit. Hsu *et al* (1996) menyatakan bahwa suhu penempelan primer tidak melebihi atau kurang dari suhu diasosiasi primer tersebut, dengan tidak menempelnya primer maka enzim polimerase tidak bisa mengkatalis pemasangan basa nitrogen komplemen yang ada dalam reagen ke dalam DNA template yang pada akhirnya tidak akan terbentuk DNA baru.

Gambar D memperlihatkan bahwa suhu *annealing* dengan suhu 44°C dapat mengamplifikasi DNA pada sample d1, d2, d4 dan d5, dimana pada suhu ini terlihat bahwa ketebalan pita yang terbentuk relatif sama, sedangkan pada sampel d3 pita yang terbentuk sangat tipis, hal ini menunjukkan bahwa kurangnya kehomogenan DNA yang diambil pada saat proses PCR. Intensitas pita yang semakin meningkat berarti bahwa kuantitas DNA yang terbentuk menjadi lebih banyak serta terbentuknya *smear* yang sangat tipis juga menandakan bahwa DNA non target pada suhu *annealing* 44°C yang terbentuk lebih sedikit dibandingkan dengan suhu 43°C dan 45°C.

Keadaan yang demikian ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang diberikan sesuai untuk primer yang digunakan yang memiliki suhu disosiasi (*melting temperature*) sebesar 48,8°C untuk primer *forward* dan 47,4°C untuk primer *reverse*, berarti bahwa suhu ini tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah, sehingga untuk memperoleh DNA dalam jumlah banyak dengan spesifisitas tinggi sangat besar. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan Erlich (1989) bahwa untuk

meningkatkan spesifisitas DNA hasil PCR bisa dilakukan salah satunya dengan cara meningkatkan suhu *annealing*-nya.

Hasil elektroforesis pada gambar C dan E memiliki ketebalan pita yang terbentuk sangat tipis, hal ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang kurang sesuai dengan primer yang diberikan sehingga proses amplifikasi sedikit terhambat serta adanya *smear* yang tebal berarti bahwa ada DNA non target yang terbentuk. Erlich (1989) menyatakan bahwa untuk mengatasi masalah adanya DNA non target yang ditunjukkan dengan adanya fragmen tambahan yang berbeda ukurannya dengan fragmen DNA target dan sering kali fragmennya lebih besar dari fragmen DNA target diantaranya melalui peningkatan suhu *annealing* dan menggunakan primer yang lebih panjang sehingga dengan panjangnya primer spesifisitasnya cukup baik.

Berdasarkan amplifikasi PCR mtDNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang terlihat pada Gambar C, D dan E, menunjukkan amplifikasi PCR mtDNA menggunakan primer COIL dan COIH menghasilkan pita tunggal mtDNA yang terletak pada ukuran sekitar 950 bp. Dari 5 sampel DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans*) pada masing-masing gambar dengan suhu berbeda yang berhasil diekstraksi dan dispektrofometer, semua sampel menghasilkan produk PCR dengan ketebalan pita yang berbeda-beda. Dari ketebalan pita yang terbentuk, terlihat bahwa gambar C sampel 2 dan 4, gambar D sampel 1, 2, 4 dan 5, gambar E sampel 1, 2 dan 3 memiliki ketebalan pita yang lebih tebal dibandingkan dengan sampel yang lain. Ketebalan pita yang sama menunjukkan bahwa kehomogenan DNA yang relatif sama dan adanya *smear* juga masih terlihat pada sampel. Wahyudi (2007) menjelaskan hal ini menunjukkan bahwa

proses amplifikasi masih bisa berlangsung baik, namun diikuti dengan terbentuknya DNA non target yang tidak diinginkan yang ditunjukkan oleh *smear* yang terbentuk.

Pandangan Al-Qur'an terhadap proses amplifikasi yang menggunakan suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dijelaskan dalam surat An-Nuur (24) ayat 35:

﴿ اللَّهُ نُورُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ مِثْلُ نُورِهِ كَمِشْكُوتٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ شَجَرَةٍ مُبْرَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ زَيْتُهَا يُضِيءُ وَلَوْ لَمْ تَمْسَسْهُ نَارٌ نُورٌ عَلَى نُورٍ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَنْ يَشَاءُ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ لِلنَّاسِ وَاللَّهُ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ﴾

Artinya: “Allah (Pemberi) cahaya (kepada) langit dan bumi. perumpamaan cahaya Allah, adalah seperti sebuah lubang yang tak tembus[1039], yang di dalamnya ada Pelita besar. Pelita itu di dalam kaca (dan) kaca itu seakan-akan bintang (yang bercahaya) seperti mutiara, yang dinyalakan dengan minyak dari pohon yang berkahnya, (yaitu) pohon zaitun yang tumbuh tidak di sebelah timur (sesuatu) dan tidak pula di sebelah barat(nya)[1040], yang minyaknya (saja) hampir-hampir menerangi, walaupun tidak disentuh api. **cahaya di atas cahaya (berlapis-lapis)**, Allah membimbing kepada cahaya-Nya siapa yang dia kehendaki, dan Allah memperbuat perumpamaan-perumpamaan bagi manusia, dan Allah Maha mengetahui segala sesuatu.”

Secara tersirat, ayat diatas menjelaskan bahwa cahaya (panas) yang berlapis-lapis (berbeda tingkatan) tentunya akan menghasilkan panas yang berbeda tiap lapisnya, sama halnya dengan hasil penelitian yang menggunakan suhu *annealing* pada proses amplifikasi dengan suhu berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) tentunya akan menghasilkan tingkat ketebalan pita yang berbeda pada masing-masing suhu. Karena untuk menghasilkan ketebalan pita yang bagus suhu *annealing* harus disesuaikan dengan primer yang digunakan.

Panjang genom mtDNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang teramplifikasi menghasilkan pita tunggal daerah kontrol (D-loop) mtDNA dengan ukuran 950 bp. Ukuran tersebut relatif sama dengan ukuran daerah kontrol (D-loop) mtDNA pada jenis udang yang lain. Amplifikasi pada udang Vanname berukuran 600 bp (Annisa, 2008) dan udang galah memiliki panjang susunan basa antara 700-1500 bp (Mandayasa, 2007). Hal ini sesuai dengan ukuran daerah kontrol (D-loop) mtDNA pada udang dengan genus *Metapenaeus*, yakni berkisar antara 200 – 1.900 bp (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2013). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat keberhasilan amplifikasi dengan suhu *annealing* 44 C° dan menggunakan primer COIL dan COIH berhasil mengamplifikasi daerah kontrol (D-loop) pada udang jari (*Metapenaeus elegans*).

D-loop merupakan daerah mtDNA yang memiliki peranan penting dalam replikasi mtDNA dengan variasi sekuens tinggi. D-loop juga memiliki tingkat mutasi dan polimorfisme yang paling tinggi dibandingkan dengan daerah lain pada mtDNA. Daerah Hipervariabel 1 pada D-loop mtDNA bersifat sangat variabel dan mempunyai laju evolusi yang cepat. Oleh karena sifatnya tersebut, daerah ini sangat beragam antar individu tetapi sama untuk kerabat yang satu garis keturunan ibu. Laju mutasi sejauh ini diketahui 1:33 generasi, sehingga perubahan urutan nukleotida hanya akan terjadi setiap 33 generasi (Passarge, 2007).

Irmawati (2003) menjelaskan bahwa keberhasilan penggandaan DNA tergantung pada konsentrasi dan kemurnian sampel DNA, *Taq polimerase*, ukuran panjang primer, komposisi primer dan tingkat homologi primer dengan DNA target, sehingga faktor-faktor tersebut harus dikontrol secara hati-hati. Fatchiyah *et al.*, (2011) menambahkan bahwa kemurnian DNA target sangat penting karena

ketidak murnian suspensi DNA dapat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA polimerase. Meskipun demikian, pada kondisi tertentu, amplifikasi PCR masih dapat bekerja dalam suspensi kasar.

