

Primer Design of *EDNRB* Gene Exon 5 and PCR Optimization for Gene Mutation Analysis in *Hirschsprung's Disease*

Septiasri Anggun^{1*} & Yuni Ahda¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Indonesia;

Article History

Received : April 25th, 2025

Revised : May 01th, 2025

Accepted : May 08th, 2025

*Corresponding Author:

Septiasri Anggun, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Kota Padang, Indonesia;

Email:

Septiaanggun11@gmail.com

Abstract: HD disease is a common cause of neonatal intestinal obstruction. HD disease is a congenital disorder of the colon characterized by the absence of parasympathetic ganglion cells in the sub mucosal plexus of Meissneri and the mienterikus plexus of Auerbach. Objective: To design specific primers for amplification of exon 5 in *EDNRB* gene and test the specificity in silico. To determine the optimum PCR conditions for amplification of exon 5 in *EDNRB* gene. Methods This type of research is descriptive. The purpose of descriptive research is to provide an overview or description of the *EDNRB* exon 5 gene primer design and PCR optimization. Electrophoresis results showed the temperature of 56 oC is the right temperature characterized by a single band and looks the thickest and brightest with the appropriate amplicons size of 367 bp. The results for the *EDNRB* gene primer exon 5 obtained the optimum concentration of 0.8 µM. This is characterized by DNA bands that look clear and thickest. The specific sequence of forward primer is 5'ATTTCAGAGACGGGAAG TGG3' reverse primer is 5'GGCACT CACTCATCATCTTG 3' which produces amplicons with a length of 367 bp. The optimum annealing temperature is 56 oC and the optimum primer concentration is 0.8 µM.

Keywords: *EDNRB* gene, HD, primer design, optimization.

Pendahuluan

Obstruksi usus pada neonatus sering kali disebabkan oleh HD, kelainan bawaan pada kolon yang ditandai dengan tidak adanya sel ganglion parasimpatis di pleksus submukosa Meissner dan pleksus mienterikus Auerbach. Rektum dan sigmoid mengandung 90% dari kelainan ini. Aganglionosis Kolon Total (TCA) merupakan bentuk HD yang relatif jarang terjadi yang mencakup 2% hingga 13% dari semua kasus dan didefinisikan sebagai aganglionosis yang meluas dari anus hingga setidaknya katup ileosekal, tetapi tidak lebih dari 50 cm proksimalnya (Setiadi *et al.*, 2021).

Tidak adanya ganglia di dinding usus (aganglionosis coli) merupakan hasil dari gangguan migrasi, proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel induk saraf (NCC), yang menyebabkan HD, kelainan perkembangan sistem saraf enterik (ENS). Salah satu struktur

embrionik penting yang memunculkan berbagai jenis sel, termasuk ENS, adalah krista neuralis (NC). HD diklasifikasikan sebagai neurokriptopati karena sebagian besar penyebab etiopatogenetik utama dalam perkembangannya adalah anomali NC. Penyumbatan fungsional, yang secara klinis terbukti segera setelah lahir, disebabkan oleh tidak adanya sama sekali ganglia ENS yang diproduksi di segmen usus yang terkena dampak. Tanda yang paling umum adalah kurangnya peristaltik usus, yang mencegah feses mengalir ke rektum (Torroglosa *et al.*, 2019; Etskovitz *et al.*, 2024).

Aganglionosis, atau kurangnya sel ganglion di pleksus mienterikus dan submukosa usus distal, merupakan karakteristik HD, kelainan motilitas bawaan. Diyakini bahwa hal ini terjadi akibat ketidakmampuan prekursor sistem saraf enterik (ENS) untuk menjajah usus distal selama perkembangan embrio (Silambi *et al.*, 2020). Salah satu kelainan gastrointestinal bawaan yang

paling umum, HD dapat mengakibatkan obstruksi gastrointestinal atau konstipasi setelah lahir, yang menyebabkan pasien mengalami penderitaan fisik dan emosional yang parah. Dominasi sistem saraf enterik yang tidak lengkap merupakan indikasi umum penyakit Hirschsprung, yang dapat menyebabkan konstipasi berkepanjangan dan gerakan usus yang terhambat (Xiao *et al.*, 2023).

Kondisi bawaan pada sistem pencernaan yang dikenal sebagai penyakit Hirschsprung (HD) ditandai dengan tidak adanya sel ganglion sebagian atau seluruhnya di bagian usus besar. Sembelit parah, kembung, muntah, dan perut kembung adalah beberapa gejala yang disebabkan oleh penyakit ini, yang mencegah buang air besar secara teratur dan menyebabkan penumpukan di area usus besar yang terkena. Patogenesis HD atau megakolon bawaan terkait dengan cacat perkembangan yang disebabkan oleh kegagalan migrasi sel kista saraf. Sembelit kronis pada bayi baru lahir sering kali merupakan akibat dari kelainan motilitas, yang muncul ketika sel-sel neurogenik primitif ini tidak dapat tumbuh di pleksus submukosa dan intermienterik usus (Wijayana *et al.*, 2023).

Tidak adanya sel ganglion di pleksus submukosa (Meissner) dan mienterikus (Auerbach) menyebabkan kondisi yang dikenal sebagai megakolon kongenital (HD), yang ditandai dengan hilangnya kemampuan dilatasi dan peristaltik usus (Khorana *et al.*, 2021). Secara global, prevalensi HD bervariasi antara 1 dalam 2.000 dan 1 dalam 12.000 kelahiran, dengan anak laki-laki memiliki insiden 4:1 lebih tinggi daripada anak perempuan (Palissei *et al.*, 2021). Tidak adanya sel ganglion di pleksus submukosa (Meissner) dan mienterikus (Auerbach) menyebabkan kondisi yang dikenal sebagai megakolon kongenital (HD), yang ditandai dengan hilangnya kemampuan dilatasi dan peristaltik usus (Khorana *et al.*, 2021).

109 pasien yang menjalani biopsi rektal digunakan untuk membuat 91 pasien HD untuk penelitian Andi Sinapati. Dengan rasio 1,37:1, kasus HD menunjukkan bahwa jumlah perempuan lebih banyak daripada laki-laki. Bayi baru lahir (26,61%), bayi/balita (50,46%), anak-anak berusia 5–13 tahun (14,69%), dan remaja (8,24%) adalah empat kelompok usia yang menjadi dasar pemisahan kasus. Distensi lambung dan muntah hijau dengan riwayat

eliminasi mekonium yang tertunda merupakan gejala khas pada bayi baru lahir, sedangkan konstipasi kronis dan distensi lambung umum terjadi pada bayi, balita, anak-anak, dan remaja. 33,94% kasus menjalani pemeriksaan enema barium, dan rektosigmoid memiliki gambaran zona transisi yang paling umum (45,9%). Empat puluh pasien (36,70%) menjalani operasi definitif menggunakan pendekatan Duhamel dalam bentuk prosedur pull-through (Palissei *et al.*, 2021).

HD lebih umum terjadi pada anak laki-laki daripada anak perempuan, dengan rasio 4:1. Negara Amerika memiliki prevalensi HD pada neonatus diperkirakan 1 kasus dalam 5.400–7.200, sedangkan di negara lain, berkisar antara 1:1.500 hingga 1:7.000 kelahiran hidup. Masih belum jelas seberapa umum HD di Indonesia. Meskipun demikian, diperkirakan 1.400 bayi baru lahir dengan HD akan lahir setiap tahun dari 220 juta orang dengan tingkat kelahiran 35 per juta (Damayanti *et al.*, 2023).

HD adalah penyakit rumit yang dipengaruhi oleh banyak variabel keturunan yang berbeda. Gen RET, GDNF, NRTN, SOX10, EDNRB, EDN3, ECE1, ZFH1B, TCF4, PHOX2B, KBP1, dan L1CAM adalah 12 gen yang telah dikaitkan dengan kasus HD. RET, EDNRB, dan SOX10 adalah tiga gen utama yang paling memengaruhi perkembangan HD. Gen EDNRB, yang memiliki tujuh ekson dan enam intron dan panjangnya sekitar 24 kilobase, ditemukan di wilayah q22 kromosom 13. Keluarga reseptor berpasangan protein-G, yang mencakup protein EDNRB yang dihasilkan dari gen ini, mengikat ligan endotelin (ET) untuk mengirim sinyal ekstraseluler. EDNRB sangat penting untuk migrasi dan diferensiasi sel kista saraf menjadi sel ganglion selama perkembangan embrio; sel-sel ini terkait dengan penyakit megakolon (Wei *et al.* 2020). Selain gen RET, yang terdapat pada sebagian besar pasien HD dan memiliki pengaruh yang signifikan, komponen genetik terpenting dalam timbulnya penyakit HD adalah gen RET (Damayanti *et al.*, 2023).

Gen EDNRB menghasilkan reseptor endothelin tipe B, protein reseptor protein yang ditemukan pada permukaan sel yang berinteraksi dengan protein lain (Chomdej *et al.*, 2018). Fungsi reseptor endothelin B, yang mengendalikan migrasi dan diferensiasi sel saraf selama perkembangan sistem saraf enterik, dapat

dipengaruhi oleh mutasi pada gen EDNRB. Tidak adanya sel saraf di usus besar dapat terjadi akibat perkembangan sel saraf abnormal yang disebabkan oleh gangguan fungsi reseptor endothelin B (Karim et al., 2021). Sebuah penelitian oleh Amiel et al. (1996) mengungkapkan bahwa ekson 5 memiliki varian heterozigot. Jenis mutasi ditemukan yaitu mutasi missense transversi (GGG→T*GG).

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat

Penelitian berlangsung di Oktober - Februari 2025 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah deskriptif. Tujuan penelitian deskriptif adalah untuk memberi gambaran atau deskripsi mengenai desain primer gen EDNRB ekson 5 dan optimasi PCR.

Alat dan Bahan

Alat untuk sterilisasi adalah *autoclave* (Tomy Japan). Alat yang digunakan untuk desain primer adalah komputer dan *software* bioinformatik. Alat yang digunakan untuk ekstraksi DNA yaitu: mikropipet (COMECTA), *microtube* 1,5 ml (ExtraGene), *centrifuge* (Labnet Internasional), *Thermo Shaker* (Biosan), *vortex* (LSE vortex mixer), *spin down* (Bio Rad), *ice box*. Alat untuk kuantifikasi dan kualifikasi DNA yaitu: nanofotometer (Implent), mikropipet 0,1 - 2,0 µL, *vortex* (LSE vortex mixer). Untuk rangkaian kegiatan amplifikasi DNA digunakan mesin *thermal cycler* (SensoQuest), tabung PCR (ExtraGene), mikropipet (COMECTA), *vortex* (LSE vortex mixer), *Spin down* (Bio Rad), *Tube's plate*, *ice box*. Peralatan elektroforesis diantaranya: mesin elektroforesis (*ThermoFisher*), *Microwave* (Sharp), *plastic frame*, sisir sumur dan mikropipet (COMECTA). Untuk visualisasi hasil elektroforesis digunakan *Gel Documentation* (Uvitec).

Bahan penelitian yaitu darah pasien penderita *Hirschsprung's Disease*. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit dari Promega,

yang terdiri atas: *cell lysis solution*, *nucleic lysis solution*, *protein precipitation solution*, *DNA rehydration solution*, *RNase A solution*. Bahan yang digunakan dalam amplifikasi DNA yaitu GoTaq Green Master MIX (Promega), primer forward dan primer reverse, *nuclease-free water* (NFW), Tris-HCl, *Natrium Hidroksida* (NaOH), *Ethylene Diamine Tetra-Acetic Acid* (EDTA), *Ultra Pure Distilled Water* (ddH₂O), alumunium foil, etanol absolut, tips steril, alkohol 70%, *buffer TE* pH 8, *buffer TAE* 50x. Bahan yang digunakan untuk elektroforesis adalah *agarose*, *buffer TAE* 1x, *DNA ladder* 100 bp, *loading dye*, GelRed.

Prosedur Penelitian

Persiapan penelitian

a. Sterilisasi alat

Tip, *microtube* dan PCR *tube* disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi (*Pound per Square Inch*) selama 15 menit. Alat tidak tahan panas disterilisasi permukaannya menggunakan alkohol 70%.

b. Pembuatan 1 M Tris-HCl pH 8 (100 mL)

Pembuatan 1 M Tris-HCl pH 8 sebanyak 100 mL dibuat dengan cara menimbang 12,112 gram trisbase lalu ditambahkan 80 mL ddH₂O. pH larutan disesuaikan dengan menambahkan HCl secara perlahan hingga pH larutan menjadi 8 lalu larutan disterilisasi.

c. Pembuatan 0,5 M EDTA pH 8 (500 mL)

Stok 0,5 M EDTA dibuat dengan menimbang 93,05 gram EDTA dan dilarutkan dengan 400 ml ddH₂O. pH larutan dibuat hingga 8,0 dengan menambahkan NaOH pekat sedikit demi sedikit kemudian pH larutan diukur menggunakan pH meter. Volume larutan dicukupkan 500 ml dan disterilisasi menggunakan *autoclave*.

d. Pembuatan Buffer TE pH 8 (100 mL)

Buffer TE dibuat dengan menambahkan 1 mL Tris HCl 1 M (pH 8,0) dan 0,2 mL EDTA 0,5 M (pH 8,0). Volume larutan dicukupkan hingga 100 mL dengan menambahkan ddH₂O lalu diukur menggunakan pH meter. Larutan dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave*.

e. Pembuatan Buffer TAE 50X (100

mL)

TAE 50x dibuat dengan cara menimbang 24,4 g Tris-base lalu dilarutkan dengan 57,1 mL asam asetat glasial dan 10 mL 0,5 M EDTA (pH 8) ke dalam botol schott. Volume larutan dicukupkan 100 mL dengan ditambah ddHO. Larutan disterilisasi menggunakan *autoclave*.

f. Pembuatan Buffer TAE 1X (100 mL)

TAE 1x dibuat sebanyak 100 mL dengan mencampurkan 1 mL TAE 50x dengan 99 mL ddHO dan larutan dihomogenkan.

Pelaksanaan Penelitian

a. Desain Primer gen EDNRB

Situs web *Genious Prime* digunakan untuk merancang primer. Situs web NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) menyediakan urutan gen EDNRB (Nomor akses: NG_011630.3) dalam format *GenBank*. Selain itu, primer potensial dipilih berdasarkan standar parameter primer yang sesuai. Primer yang baik memiliki suhu (T_m) 52–58 oC dan panjang 18–22 bp (Badriyya & Achyar, 2022). Perbedaan T_m primer yang baik adalah sekitar 50C. Untuk mencegah adhesi antara pasangan primer dan pembentukan struktur yang dikenal sebagai jepit rambut, primer yang baik juga harus memiliki komplementaritas diri yang rendah (Saraswati & Wahyuni, 2019).

Selain itu, Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>), yang dapat diakses di situs web NCBI, digunakan untuk menguji spesifisitas primer yang memenuhi persyaratan untuk primer yang sangat baik secara silico. Selain itu, halaman NCBI menawarkan layanan *Primer-Basic Local Alignment Search Tool* (Primer-BLAST) untuk desain primer secara silico. Tujuan dari Primer-BLAST adalah untuk memastikan apakah gen target di GenBank dapat diikat oleh desain primer daring (*Unable to find information for 10958789, n.d.*).

b. Ekstraksi DNA Genom dari Darah

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan sampel darah pasien *Hirschsprung's Disease*. Darah pasien *hirschsprung* diambil dari rumah sakit M. Djamil Sumatera Barat. Darah diekstraksi menggunakan protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit dari Promega dengan prosedur sebagai

berikut: 900 μ L *cell lysis solution* dimasukkan kedalam *centrifuge* ukuran 1.5 mL. Selanjutnya 300 μ L darah EDTA dimasukkan kedalam tabung yang berisi *cell lysis solution* lalu tabung dibolak-balik 5-6 kali agar homogen. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar untuk melisis sel darah merah lalu disentrifugasi pada 13.000-16.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang tanpa membuang pellet putih yang terlihat. Selanjutnya 600 μ L *cell lysis solution* dimasukkan ke dalam tube yang berisi pellet lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 x g selama 1 menit. Setelah disentrifugasi supernatan dibuang.

Kemudian 300 μ L *nuclear lysis solution* serta 100 μ L *protein precipitation solution* ditambahkan ke dalam tube yang berisi sel-sel DNA dan homogenkan larutan dengan mikropipet secara *up & down*, kemudian divortex selama 10-20 detik. Selanjutnya, disentrifugasi pada 13.000-16.000 x g pada suhu kamar selama 3 menit. Setelah disentrifugasi supernatan dipindahkan ke tabung baru yang berisi 900 μ L larutan isopropanol. Untaian DNA yang menyerupai benang putih terlihat jelas setelah cairan tersebut secara bertahap digabungkan dengan cara dibalik. Sentrifus selama satu menit pada suhu ruangan pada 13.000–16.000 x g. Pelet putih kecil akan mewakili DNA.

Selanjutnya 300 μ L etanol 70% suhu kamar dimasukkan ke dalam tube yang berisi DNA. Setelah membalikkan tabung beberapa kali dengan hati-hati untuk membersihkan pelet DNA, isinya disentrifugasi selama satu menit pada suhu ruangan pada 13.000–16.000 x g. Setelah itu, tabung yang berisi pelet dibalik dan dibiarkan pada tisu selama 10 hingga 15 menit hingga kering, sementara supernatan dibuang. Setelah itu, rehidrasi DNA dengan menginkubasinya pada suhu 65°C selama satu jam setelah menambahkan 50 μ L larutan Rehidrasi DNA ke tabung kering. Secara berkala, tabung diketuk perlahan untuk mencampur larutan.

Menentukan konsentrasi dan kemurnian DNA dengan alat spektrofotometer nanodrop (Implan NP-80) dengan DNA yang diekstraksi, konsentrasi dan kemurnian (rasio absorbansi pada 260/280). Alat nanofotometer memiliki prinsip kerja dengan cara sebagai berikut: alat

Nanofotometer dihidupkan berdasarkan SOP, dengan 2 μ L DNA *Rehydration solution* sebagai blanko, dan 2 μ L sampel DNA diambil untuk diukur konsentrasi dan kemurniannya. DNA murni dicirikan memiliki rasio absorbansi 260/280 yang berkisar antara 1,8 dan 2,0. Protein diukur pada panjang gelombang 280 nm. Panjang gelombang 260 nm digunakan untuk mengukur konsentrasi DNA menggunakan nanodrops (Setiaputri et al., 2020). Selain itu, DNA disimpan pada suhu -20°C untuk penyimpanan.

c. Optimasi Suhu Annealing dengan Gradien PCR

Optimasi suhu annealing menggunakan gradien PCR dengan komponen mix PCR yang akan digunakan sesuai pada (Tabel 1) terdiri dari GoTaq Green Master Mix 12,5 μ L, primer *EDNRB* 10 μ M *forward* dan *reverse* 2 μ L, *Nuclease-Free water* 6,5 μ L, dan DNA *template* 2 μ L. Setelah itu, program PCR dibagi menjadi tiga tahap: tahap denaturasi awal, yang berlangsung selama lima menit pada suhu 95°C ; tahap pengulangan siklus, yang berulang sebanyak 35 kali dan terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik; tahap annealing, yang berlangsung selama 30 detik pada gradien suhu $57,3^{\circ}\text{C}$, $58,3^{\circ}\text{C}$, $59,3^{\circ}\text{C}$, dan $60,0^{\circ}\text{C}$; dan tahap suhu elongasi, yang berlangsung selama lima menit pada suhu 72°C .

d. Optimasi Konsentrasi Primer dan DNA Template

Komponen reaksi PCR untuk pengaturan konsentrasi primer dan DNA template sama dengan komponen untuk pengaturan suhu annealing, kecuali bahwa konsentrasi primer *forward* dan *reverse* diatur pada rentang konsentrasi 0,3-0,8 μ M dan konsentrasi primer dan DNA diatur berdasarkan hasil pengaturan konsentrasi DNA. Untuk membuat 25 μ L, ditambahkan *nuclease free-water*. Suhu annealing yang ideal digunakan untuk mengatur program PCR. Elektroforesis gel agarosa 1,5% digunakan untuk memvisualisasikan hasil PCR. Pita DNA yang paling tebal dan ukuran ampikon yang tepat digunakan untuk menghitung konsentrasi primer yang ideal.

e. Elektroforesis

Produk PCR pada penelitian ini divisualisasikan dengan menggunakan *gel*

agarose 1,5% dengan menimbang sebanyak 1,5 gram bubuk *agarose* yang dilarutkan dalam larutan TAE 1X volume 100 mL, kemudian panaskan campuran larutan tadi di dalam oven selama 20 detik sampai bubuk *agarose* benar-benar terlarut. Lalu diamkan larutan yang sudah dipanaskan tadi sampai sedikit dingin dan tuang larutan kedalam cetakan yang sudah disiapkan. Setelah larutan *gel agarose* tadi mengeras pindahkan *gel agarose* tersebut ke dalam alat elektroforesis yang sudah berisi larutan TAE dan pastikan *gel agarose* benar-benar terendam larutan.

Selanjutnya pipet larutan *gel red* 15 μ L, *ladder* 100 bp 3 μ L, *loading dye* 2 μ L, serta untuk DNA sampel campur 2,5 μ L *gel red*, dan 2,5 μ L sampel DNA. Pada sampel DNA tidak perlu ditambahkan *loading dye* dikarenakan sampel DNA sudah dicampur dengan larutan GoTaq Green Master Mix pada tahapan mix PCR sebelumnya. Setelah semua komponen larutan dimasukkan ke dalam sumur *gel agarose*, proses elektroforesis dirunning selama 40 menit pada tegangan 100 volt. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan UVITEC.

Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh pada hasil penelitian dibahas secara kualitatif. Data yang akan dianalisis adalah 1) sekuens primer hasil desain, 2) hasil optimasi suhu annealing, 3) optimasi konsentrasi primer, 4) optimasi DNA template, dan 5) hasil amplifikasi ekson 1 menggunakan suhu annealing, primer dan DNA template yang optimal.

Hasil dan Pembahasan

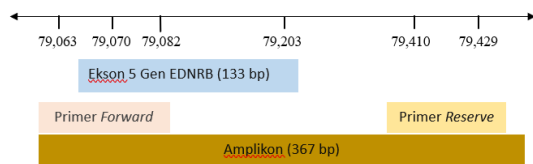
Desain Primer Gen *EDNRB* dan Uji Spesifisitas secara *in Silico*

Hasil penelitian ini dilakukan desain primer secara *in silico* menggunakan program *Genious prime* pada sekuens gen *EDNRB* ekson 5 (*Accession number*: NG_011630.3). Terdapat pasangan primer yang didesain menggunakan program *Geneious prime* (Tabel 1).

Tabel 1. Kandidat Primer Gen *EDNRB* Ekson 5



Pasangan primer yang dipilih memiliki panjang basa 20, *temperature melting* (Tm) 56.2 – 57.2 °C, dan %GC 50%. Desain primer yang dipilih menghasilkan amplikon 367 bp. Ekson 5 memiliki panjang 133 bp yang berlokasi pada nukleotida 79,070 – 79,203. Primer *Forward* menempel pada nukleotida ke 79,063 – 79,082 dan primer *Reverse* menempel pada nukleotida ke 79, 410 – 79,429.



Gambar 1. Posisi Penempelan Primer pada Ekson 5 Gen *EDNRB*.

Optimasi Kondisi PCR

a. Hasil Ekstraksi DNA

DNA genom diekstraksi dari 6 sampel darah manusia yang tidak terindikasi *Hirschsprung disease*. Kemudian DNA hasil ekstraksi diukur kemurnian dan konsentrasinya menggunakan alat nanophotometer. Kemurnian larutan DNA diukur pada panjang gelombang A260/A280. (Tabel 2) hasil kemurnian DNA dan konsentrasi pada sampel.

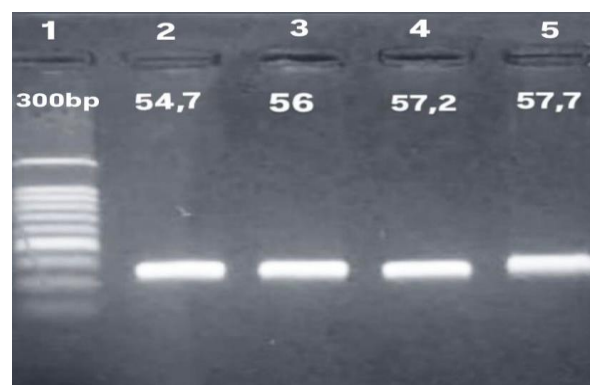
Tabel 2. Hasil Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Sampel	Konsentrasi	Kemurnian
Sampel 1	152.40	1,910 ng/ µl
Sampel 2	122,05	1,885 ng/ µl

b. Optimasi Suhu *Annealing* dengan *Gradient PCR*

Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk memperoleh suhu yang optimum untuk primer

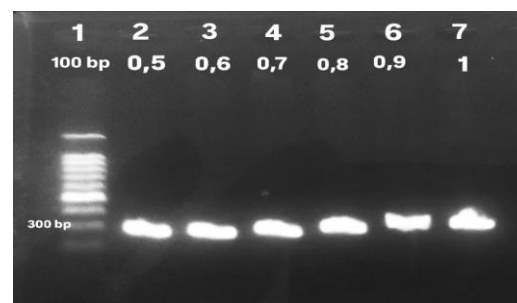
menempel pada DNA cetakan saat melakukan PCR. PCR gradien dilakukan pada beberapa suhu untuk menentukan suhu ideal. Kisaran suhu *annealing* yang digunakan adalah antara 54,7 dan 57,7 derajat Celsius. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa suhu 56°C merupakan suhu yang tepat ditandai dengan pita tunggal dan tampak paling tebal dan paling terang dengan ukuran amplikon yang sesuai yaitu 367 bp. Karena suhu *annealing* (Ta) yang ideal akan mempengaruhi kinerja proses amplifikasi, maka dilakukan optimasi suhu *annealing* untuk mencapai kondisi PCR yang ideal (Silalahi et al., 2021).



Gambar 2. Hasil Elektroforesis *Gradient PCR*. Ladder 100 bp, suhu *annealing* 54,7 °C, 56 °C, 57,2 °C, 57 °C

c. Optimasi Konsentrasi Primer

Variasi konsentrasi primer yang digunakan adalah 0,5 µM, 0,6 µM, 0,7 µM, 0,8 µM, 9 µM, 1 µM . Hasil untuk primer gen *EDNRB* ekson 5 diperoleh konsentrasi optimum yaitu 0,8 µM. Hal ini ditandai dengan pita DNA terlihat jelas dan paling tebal. Beberapa faktor yang dapat dimodifikasi untuk mendapatkan hasil pengujian yang optimal dalam PCR yaitu suhu *annealing* dan konsentrasi primer



Gambar 3. Hasil Elektroforesis Optimum Konsentrasi Primer. Ladder 100 bp, konsentrasi adalah 0,5 µM, 0,6 µM, 0,7 µM, 0,8 µM, 9 µM, 1 µM.

Pembahasan

Hasil penelitian ini dilakukan desain primer Gen *EDNRB* (*Accession number*: NG_011630.3) pada ekson 5 dengan menggunakan program *Geneious Primer*. Hasil penelitian ini diperoleh pasangan primer *forward* 5'-ATTTTCAGAGACGGAAGTGG-3' dan *reverse* 5'GGCACT CACTCATCATCTTG 3'. Primer yang memenuhi persyaratan parameter primer dianggap baik. Kriteria tersebut adalah: 3'dimer dan tidak membentuk struktur dimer pada ujung 3'; suhu leleh (T_m) 55-65°C; dan persentase G dan C (%GC) 40-60%. Primer harus kuat dan sulit dipecah. Urutan berulang yang dapat menyebabkan ketidakstabilan tidak boleh ada dalam primer. Struktur jepit rambut yang dibentuk oleh primer dapat menurunkan efisiensi PCR. Panjang primer biasanya berkisar antara 18 hingga 30 oligonukleotida. Diharapkan bahwa panjang ini akan cukup untuk mengikat italic pada suhu annealing dan menghasilkan urutan tertentu (Pranata & Ahda., 2021).

Menurut Yustinadewi et al. (2018), nilai T_m ideal primer berada di antara 52 dan 58 oC. Jika suhu leleh pasangan primer berbeda kurang dari 5 °C, PCR dapat diselesaikan secara efektif. Karena primer dimasukkan ke dalam tabung yang sama untuk percobaan PCR, perbedaan suhu leleh optimal pasangan primer adalah nol (Aulia et al., 2023). T_m sangat penting dalam menetapkan suhu annealing karena ia mengendalikan stabilitas hibrida DNA. Merupakan tantangan bagi primer dan template untuk menghasilkan ikatan hidrogen jika T_m tinggi. Ketika T_m terlalu rendah, primer dapat menempel pada bagian lain meskipun tidak sepenuhnya sesuai, sehingga menghasilkan hasil yang tidak spesifik. Spesifisitas PCR ditemukan paling kuat dipengaruhi oleh toleransi ketidakcocokan (Borah, 2011).

Primer spesifik target dibuat menggunakan primer BLAST. Komponen penting dari prosedur amplifikasi DNA (PCR) adalah primer. Primer akan menemukan target gen tertentu untuk identifikasi dan amplifikasi. Spesifisitas primer terhadap target merupakan salah satu sifatnya yang perlu diperhitungkan. Primer yang hanya akan mengamplifikasi target gen yang diinginkan adalah primer yang ideal (Anwar et al., 2022).

Berdasarkan posisi gen *EDNRB*, 13q11, primer berhasil dan spesifik mengikat kromosom 13 (Gambar 2), menurut temuan uji primer-BLAST. Primer-BLAST menunjukkan hasil PCR sepanjang 367 bp, yang konsisten dengan panjang yang dibuat dengan perangkat lunak *Geneious Prime*. Karena suhu annealing (T_a) yang ideal akan memengaruhi kinerja proses amplifikasi, optimasi suhu annealing dilakukan untuk mencapai kondisi PCR yang ideal (Silalahi et al., 2021). (T_m-5)°C hingga (T_m+5)°C dapat digunakan untuk menghitung suhu annealing (Setyawati & Zubaidah, 2021). Proses amplifikasi akan terhambat jika suhu annealing terlalu tinggi, dan primer dapat terhubung ke lokasi yang tidak spesifik jika terlalu rendah (Khaira et al., 2023). Suhu anil dan konsentrasi primer merupakan dua variabel yang dapat diubah untuk mendapatkan hasil uji PCR terbaik (Mardiana et al., 2023). Kisaran suhu yang digunakan dalam penelitian ini adalah 54,7°C hingga 57°C.

Suhu annealing ideal 56°C kemudian dicapai dengan menjalankan temuan gradien PCR selama 35 menit sambil menggunakan agarosa 1,5% untuk memvisualisasikan hasilnya. Hasil elektroforesis (Gambar 1) mengungkapkan bahwa tidak ada pita non-spesifik dan pita DNA paling tebal dan paling terang terjadi pada suhu 56°C dengan ukuran ampikon yang tepat (367 bp). Sampel DNA yang dihasilkan memiliki konsentrasi rendah, seperti yang ditunjukkan oleh pita tebal yang terbentuk (Annisa et al., 2024). DNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah A260/A280 murni dan memiliki konsentrasi 122,05 ng/ μ l.

Optimasi konsentrasi primer dilakukan dengan menggunakan konsentrasi 0,5 μ M, 0,6 μ M, 0,7 μ M, 0,8 μ M, 9 μ M, dan 1 μ M untuk mendapatkan konsentrasi primer yang ideal. Primer dengan konsentrasi 0,8 μ M memiliki pita yang tebal dan bening serta berukuran sama dengan target, seperti terlihat pada Gambar 5. Tabrakan dimer primer, yaitu pita yang terbentuk diikuti oleh pita lain yang tidak spesifik, dapat terjadi akibat konsentrasi primer yang berlebihan atau tidak mencukupi, yang juga dapat menghambat amplifikasi (Mardiana et al., 2023). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, suhu annealing ideal gen *EDNRB* ekson 5 adalah 56 oC, dan konsentrasi primer yang ideal adalah 0,8 μ M. Nilai-nilai tersebut menghasilkan pita

DNA yang paling tebal, paling terang, dan sesuai dengan ukuran target, yaitu 367 bp.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa Sekuens spesifik primer *forward* 5'ATTTCA GAGACG GGAAG TGG3' primer *reverse* adalah 5'GGCACT CACTCATCATCTTG 3' yang menghasilkan amplicon dengan panjang 367 bp. Suhu *annealing* yang optimum adalah 56 °C dan konsentrasi primer yang optimum adalah 0,8 µM.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ucapkan terima kasih kepada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan permasalahan ini.

Referensi

- Anissa, R. K., Lisdiana, L., & Widyayanti, A. T. (2023). Optimasi Metode Nested PCR untuk Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* Ahpnd pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v13n1.p1-13>
- Amiel, J., Attié, T., Jan, D., Pelet, A., Edery, P., Bidaud, C., ... & Lyonnet, S. (1996). Heterozygous Endothelin Receptor B (EDNRB Mutations in Isolated Hirschsprung Disease. *Human molecular genetics*, 5(3), 355-357.
- Anwar, M. A., Nurjanah, S. N., & Rahayu, W. P. (2022). Aplikasi basic local alignment search tool (BLAST) NCBI pada penelitian molekuler salmonella SPP. *Syntax Literate ; Jurnal Ilmiah Indonesia*, 7(11), 15446. <https://doi.org/10.36418/syntax-literate.v7i11.9037>
- Chomdej, S., Leelawattanakul, P., Buddhachat, K., Pradit, W., Siengdee, P., Phongroop, K., & Nganvongpanit, K. (2018). ikinci. *Kafkas Universitas Veteriner Fakultas Dergisi*. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20082>
- Dzikrina, H., Hidayat, T., & Sriyati, S. (2024). Pengembangan Primer Diagnostik Menggunakan Penanda mat-K Secara In Silico untuk Mendeteksi Kelangkaan Jenis Tumbuhan Di Indonesia. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 17(1), 91-102.
- Damayanti, F., Ramadhan, A. K., Nabil, A. A., Almuwaffaq, H. W., Smith, S., & Haikal, Z. (2023). Hirschsprung's Disease: Metode Diagnosis dan Tatalaksana. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, 10(12), 3584-3594.
- Etskovitz, H., Kim, R. S., Wang, S. Z., & Nandivada, P. (2024). Surgical management of short-segment Hirschsprung disease. *World Journal of Pediatric Surgery*, 7(4), e000916.
- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1).
- Karim, A., Tang, C. S.-M., & Tam, P. K.-H. (2021). The emerging genetic landscape of hirschsprung disease and its potential clinical applications. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 638093. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.638093>
- Khorana, J., Phiromkanchanasak, P., Kumsattra, J., Klinoun, S., Aksorn, S., Chantakhaw, S., Tepmalai, K., & Singhavejsakul, J. (2021). Development of clinical referral score model for early diagnosis of hirschsprung's disease in suspected pediatric patients. *Healthcare (Basel)*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/healthcare9060678>
- Khaira, A., Achyar, A., Zulyusri, Z., Atifah, Y., Putri, D. H., & Violita, V. (2023). Primer Design and Optimization of Annealing Temperature for Analysis of Glutathione Reductase Gene Expression in Rice (*Oryza sativa* L.). *3BIO: Journal of Biological Science, Technology and Management*, 5(1), 142–148. <https://doi.org/10.5614/3bio.2023.5.1.3>
- Mardiana, A., Dhanti, K. R., Kurniawan, K., & Sulistyowati, R. (2023). Optimasi konsentrasi primer dan suhu annealing dalam mendeteksi gen *bla* pada bakteri methicillin resistant staphylococcus aureus di udara. *Borneo Journal of Medical*

- Laboratory Technology*, 6(1), 389–393.
<https://doi.org/10.33084/bjm.v6i1.6076>
- Palissei, A. S., Ahmadwirawan, A., & Faruk, M. (2021). Hirschsprung's disease: epidemiology, diagnosis, and treatment in a retrospective hospital-based study. *Journal of Thee Medical Sciences (Berkala Ilmu Kedokteran)*, 53(3).<https://doi.org/10.19106/JMedSci005302202103>
- Setiadi, Q. H., & Haikal, Z. (2021). Total Colonic Aganglionosis: Dilema Diagnosis dan Dampak Jangka Panjang. *Jurnal Kedokteran*, 10(3), 531–536.
- Sihotang, M. A., Erwindi, Y. E., Suwarni, E., & Lusianti, E. (2021). Desain Primer dan Analisis in Silico untuk Amplifikasi Gen mt-Co1 pada Tikus got (*Rattus norvegicus*). *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 1(2), 20–29.
- Sundari, S., & Priadi, B. (2019). Teknik isolasi dan elektroforesis DNA ikan tapah. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 17(2), 87–90.
- Sari, E.N., R. W. Dewi , V. R. Dewi , S. C. Yowani , P. S. Yustiantara. (2018). Desain Primer untuk amplifikasi regio promoter gen inha isolat P016 multidrug resistance Mycobacterium Tuberculosis dengan metode polymerase chain reaction. *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(1), 34–39.
- Saraswati, H., Seprianto, S., & Wahyuni, F. D. (2019). Desain primer secara in silico untuk amplifikasi gen cryiii dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33–38.
- Salsabila, N., Fadilah, F., Pramana, R. C., Mutiatul K.A., S., Romzalis, A. A., Ramadhani, D. N., Rachmawati, Y., & Arianti, O. F. (2021). Penentuan Sekuens Terbaik untuk Gen COI pada *Crocodylus rhombifer* Menggunakan SoftWare Perlprimer dan Primer Blast Sebagai Bentuk Praktikum Saat Pandemi Covid-19. *Indonesian Journal of Science Learning (IJSL)*, 2(1), 15–21.
<https://doi.org/10.15642/ijsl.v2i1.1233>
- Torroglosa, A., Villalba-Benito, L., Luzon-Toro, B., Fernández, R. M., Antiñolo, G., & Borrego, S. (2019). Epigenetic mechanisms in hirschsprung disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133123>
- Wijayana, K. A. (2023). Penyakit Hirschsprung: Sebuah Tinjauan Pustaka Tentang Patofisiologi, Terapi. *Mandala Of Health*, 16(2), 134–145.
- Wei, F., Ge, Y., Li, W., Wang, X., & Chen, B. (2020). Role of endothelin receptor type B (EDNRB) in lung adenocarcinoma. *Thoracic Cancer*, 11(7), 1885–1890.
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.13474>
- Xiao, J., Hao, L.-W., Wang, J., Yu, X.-S., You, J.-Y., Li, Z.-J., Mao, H.-D., Meng, X.-Y., & Feng, J.-X. (2023). Comprehensive characterization of the genetic landscape of familial Hirschsprung's disease. *World Journal of Pediatrics*, 19(7), 644–651.
<https://doi.org/10.1007/s12519-023-00686-x>
- Yuenleni, Y. (2019). Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(3), 51–56.
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Teknik perancangan primer untuk sekuen gen MDR-1 varian 1199 pada sampel buffy coat pasien anak dengan LLA. *Jurnal metamorfosa*, 5(1), 105–111.