

**DESAIN PRIMER GEN *RET* DAN OPTIMASI PCR PADA  
SAMPEL PASIEN *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE***

**SKRIPSI**

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh gelar  
Sarjana Sains*



**Oleh:  
NURUL AULIA  
NIM. 19032033/2019**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2023**

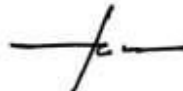
**PERSETUJUAN SKRIPSI**

**DESAIN PRIMER GEN *RET* DAN OPTIMASI PCR PADA  
SAMPEL PASIEN *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE***

Nama : Nurul Aulia  
NIM : 19032033  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 29 Mei 2023

Mengetahui:  
Ketua Jurusan Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed  
NIP. 197508152006042001

Disetujui oleh:  
Pembimbing



Dr. Yuni Anda, S.Si, M.Si.  
NIP. 196906291994032003

**PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI**

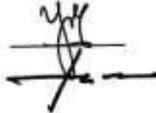
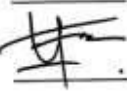
Nama : Nurul Aulia  
NIM : 19032033  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**DESAIN PRIMER GEN *RET* DAN OPTIMASI PCR PADA SAMPEL  
PASIEH *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE***

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi Departemen  
Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Padang

Padang, 29 Mei 2023

Tim Penguji

	Nama	Tanda Tangan
Ketua	: Dr. Yuni Ahda, S.Si, M.Si.	
Anggota	: Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed.	
Anggota	: Afifatul Achyar, M.Si.	

## SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

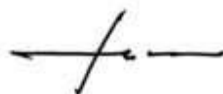
Nama : Nurul Aulia  
NIM/TM : 19032033/2019  
Program Studi : Biologi  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul "**Desain Primer Gen *RET* dan Optimasi PCR pada Sampel Pasien *Hirschsprung's Disease***" adalah benar merupakan hasil karya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya, pendapat yang ditulis dan diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 26 Juli 2023

Diketahui oleh,  
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed  
NIP. 19750815 2006042 001

Saya yang menyatakan,



Nurul Aulia  
NIM. 19032033

## Desain Primer Gen RET dan Optimasi pada Sampel Pasien Hirschsprung's Disease

Nurul Aulia

### ABSTRAK

*Hirschsprung's Disease* (HD) adalah penyebab paling umum dari obstruksi usus fungsional pada anak-anak dengan insiden di seluruh dunia berkisar antara 1:5000 dan 1:10.000 kelahiran hidup. Gen *RET* dianggap sebagai gen utama penyebab HD. setidaknya 20% dari semua kasus penyakit HD disebabkan oleh mutasi gen *RET*. Mutasi dapat berupa mutasi *nonsense*, mutasi *missense*, delesi dan insersi. Mutasi pada suatu gen dapat dilacak dengan teknik *sequencing*. Primer merupakan salah satu komponen yang penting untuk dilakukannya *sequencing*. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer spesifik gen *RET*, menentukan kondisi PCR yang optimum untuk deteksi gen *RET* dan menguji spesifisitas metode PCR.

Jenis penelitian ini merupakan penelitian deksriptif dan dilakukan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi FMIPA UNP dari bulan Desember 2022 - April 2023. Primer dirancang secara *in silico* menggunakan Primer BLAST pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dan Geneious Prime. DNA diisolasi dari pasien HD. Kondisi PCR dioptimalkan melalui optimasi suhu *annealing* dan optimasi konsentrasi primer. *Sequencing* dilakukan terhadap sampel pasien *Hirschsprung's Disease*.

Hasil dari penelitian ini adalah primer spesifik gen *RET* yaitu RET\_EX4F 5'- AAC ACA GCG AGA CTC CAT CA -3' dan primer RET\_EX4R 5'- TGG CTA CAC GGA CAC TAA ACC -3' yang menghasilkan amplicon berukuran 784 bp. Dan secara spesifik mengamplifikasi gen *RET* berdasarkan hasil uji spesifisitas secara *insilico*. Primer bekerja optimal pada suhu *annealing* 53.2°C konsentrasi primer RET\_EX4F dan RET\_EX4R masing-masing 0,4 µM. Primer berhasil mengamplifikasi secara spesifik gen *RET* dengan metode PCR secara *in vitro*.

**Kata kunci:** Gen *RET*, Desain Primer, Optimasi PCR, *Sequencing*

## **RET Gene Primer Design and Optimization in Hirschsprung's Disease Patient Samples**

**Nurul Aulia**

### **ABSTRACT**

The most frequent cause of functional bowel blockage in children is Hirschsprung's disease (HD), which affects between 1:5000 and 1:10,000 live births globally. The primary gene thought to be responsible for HD is RET. At least 20% of all instances of HD are brought on by RET gene mutations. Mutations might be nonsense, missense, deletion, or insertion mutations. Sequencing methods can be used to monitor gene mutations. Primer is a crucial part in sequencing. The objectives of this work are to create RET gene-specific primers, identify the ideal PCR conditions for RET gene detection, and evaluate the specificity of the PCR approach.

The Genetics and Biotechnology Laboratory, Department of Biology, FMIPA UNP, undertook this descriptive type of research from December 2022 to April 2023. The primers were created in silico using Geneious Prime using BLAST primers from the NCBI (National Center for Biotechnology Information). HD patient DNA was extracted. By adjusting the annealing temperature and primer concentration, the PCR conditions were improved. Samples from patients with Hirschsprung's disease were subjected to sequencing.

This study's findings included RET gene-specific primers, RET\_EX4F 5'-AAC ACA GCG AGA CTC CAT CA -3' and RET\_EX4R 5'-TGG CTA CAC GGA CAC TAA ACC -3', which generated an amplicon of 784 bp in size. and, in accordance with the outcomes of the in silico specificity test, specifically amplified the RET gene. With RET\_EX4F and RET\_EX4R primer concentrations of 0.4  $\mu$ M each, the primer performed best at an annealing temperature of 53.2 °C. By using in vitro PCR, the primer was able to precisely amplify the RET gene.

Keywords: RET Gene, Primer Design, PCR Optimization, Sequencing

## KATA PENGANTAR



*Alhamdulillahirobbil'alamin.* Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Desain Primer Gen RET dan Optimasi pada Sampel Pasien Hirschsprung’s Disease”**. Selanjutnya, sholawat serta salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Muhammad SAW *Allahumma Sholli ‘alaa Muhammad wa’alaa Ali Muhammad.*

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Keberhasilan Penulis dalam menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini dengan segala kerendahan hati Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Yuni Ahda, S. Si., M. Si. sebagai Pembimbing dan Penasehat Akademik, atas kepercayaan, bimbingan dan saran selama proses penelitian dan pembuatan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S. Si., M. Biomed. sebagai Dosen Penguji I dan Ketua Departemen Biologi, FMIPA UNP atas saran dan nasehat yang membangun.
3. Ibu Afifatul Achyar, M. Si. sebagai Dosen Penguji II atas saran, nasehat dan bimbingan selama proses penelitian.
4. Bapak/ ibu staf pegawai Departemen Biologi, Universitas Negeri Padang.

5. Kedua orang tua tercinta, Ibu Desmawati dan Ayah Hasibul Qalbi, abang Rizki Hasibul Qalbi serta keluarga Besar Tina *Family* dimanapun kalian berada, atas doa dan dukungannya.
6. Sahabat jauh dimata dekat dihati, Nur Aisyah dan Hana Adilah atas doa dan dukungannya.
7. Sahabat terdekat penulis, FebyYeriska yang telah mendukung dan membantu penulis dalam penelitian ini serta teman seperjuangan Frisca Rinaldi Putri, Nafisa Arini, Rezi Nabilah, Oliv Nurul Kanaya, Kinkin, Rida dan teman-teman KKN Batam yang telah membantu dalam proses penelitian ini.
8. Kepada diri sendiri, terima kasih karena sudah kuat bertahan dan menyelesaikan tanggung jawab ini dengan baik sampai akhir.

Penulis berharap, dengan selesainya skripsi ini dapat memberikan bantuan bagi setiap penulis, pembaca dan masyarakat pada umumnya. Oleh karena itu, diharapkan kritik dan saran bagi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi semua pihak.

Padang, 12 Mei 2023

Penulis



## DAFTAR ISI

ABSTRAK .....	i
ABSTRACT .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
A. Penyakit <i>Hirschsprung's Disease</i> (HD) .....	5
B. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	9
C. Desain Primer .....	12
D. <i>Sequencing</i> .....	13
BAB III METODE PENELITIAN .....	15
A. Jenis Penelitian .....	15
B. Waktu dan Tempat Penelitian .....	15
C. Alat dan Bahan .....	15

D. Prosedur Penelitian.....	16
BAB IV Hasil dan Pembahasan .....	22
A. Hasil .....	22
B. Pembahasan.....	22
BAB V Kesimpulan dan Saran .....	32
A. Kesimpulan .....	32
B. Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA .....	33
LAMPIRAN.....	39

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Macam-Macam Mutasi yang Terjadi pada Gen <i>RET</i> .....	8
Tabel 2. Kandidat Primer Gen <i>RET</i> .....	21
Tabel 3. Hasil Analisis BLAST NCBI ( <i>Description</i> ) .....	22

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. <i>Hirschsprung's Disease</i> .....	5
Gambar 2. Penyakit HD Tipe Panjang pada Anak Laki-Laki Berusia 2 Hari. ....	8
Gambar 3. Penyakit HD Tipe Pendek pada Anak Laki-Laki Berusia 11 Bulan. ....	8
Gambar 4 Lokasi Mutasi pada Exon 4.....	6
Gambar 5. Hasil Primer-BLAST Primer.....	22
Gambar 6. Hasil Elektroforesis <i>Gradient</i> PCR.....	22
Gambar 7. Hasil Elektroforesis Optimasi Konsentrasi Primer.. ....	22
Gambar 8. Hasil Elektroforesis Sampel Pasien HD.....	22

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Kode Etik .....	38
Lampiran 2 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Pasien HD .....	39
Lampiran 3 Hasil <i>Contig</i> primer Wilayah 18-778 .....	39
Lampiran 4 Hasil <i>Sequencing</i> Sampel Pasien HD .....	40
Lampiran 5 Hasil BLAST NCBI ( <i>Alignments</i> ).....	41
Lampiran 6 Posisi Penempelan Primer pada Gen RET .....	42

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

*Hirschsprung's Disease* (HD) adalah penyebab paling umum dari obstruksi usus fungsional pada anak-anak dengan insiden di seluruh dunia berkisar antara 1:5000 dan 1:10.000 kelahiran hidup (Ambartsumyan *et al.*, 2020). Kasus Penyakit *Hirschsprung* paling sering terjadi di Asia, diikuti oleh Afrika-Amerika dan Eropa (Haricharan & Georgeson, 2008). Di Indonesia, tidak ada data nasional mengenai kasus HD. Namun, berdasarkan *database* rumah sakit Dr. Hasan Sadikin, rumah sakit rujukan provinsi Jawa Barat di Indonesia, dalam tiga tahun terakhir tercatat 298 kasus HD (Diposarosa *et al.*, 2021).

Penyakit *Hirschsprung* ditandai dengan tidak adanya sel ganglion pada pleksus mienterikus dan pleksus submukosa usus (Raveenthiran, 2011). Akibatnya, jaringan fungsional neuron dan glia yang merupakan persarafan intrinsik saluran pencernaan, yang terdiri dari sistem saraf enterik (ENS) tidak dapat dibentuk (Heanue & Pachnis, 2007) sehingga menyebabkan obstruksi usus oleh kontraksi dan relaksasi otot polos yang tidak teratur (Sribudiani *et al.*, 2018).

Ciri khas HD ditandai dengan variasi panjang segmen aganglionik. HD segmen pendek (S-HD) merupakan aganglionosis terbatas hingga kolon sigmoid atas, diamati pada 80% kasus HD; HD segmen panjang (L-HD), merupakan aganglionosis meluas hingga fleksura limpa dan seterusnya, diamati pada 15-20% kasus HD;

sementara aganglionosis kolon total (TCA) merupakan aganglionosis mempengaruhi seluruh usus besar, diamati pada 5% kasus HD (Kapoor *et al*, 2015).

Sampai saat ini, mutasi pada 20 gen telah diidentifikasi dalam penyakit *Hirschsprung*, termasuk *rearranged during transfection (RET)*, *glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)*, *GDNF family receptor alpha 1 (GFRa1)*, *neurturin (NRTN)*, *endothelin receptor type B (EDNRB)*, *endothelin 3 (ET3)*, *zinc finger homeobox 1B (ZFHX1B) or ZEB2*, *paired-like homeobox 2b (PHOX2B)*, *SRY-box 10 (SOX10)*, *Indian Hedgehog (IHH) and Sonic Hedgehog (SHH)* (Alves *et al.*, 2013; Schriemer *et al.*, 2016; Tomuschat & Puri, 2015; Amiel & Lyonnet, 2001; Sribudiani *et al.*, 2018). Mutasi dapat berupa mutasi *nonsense*, mutasi *missense*, delesi dan insersi (Bradnock *et al.*, 2017).

Gen *RET* dianggap sebagai gen utama penyebab HD (Lorente-Ros *et al.*, 2020), karena telah diidentifikasi pada 50% kasus familial dan 15%-35% kasus sporadis HD. Secara total, setidaknya 20% dari semua kasus HD disebabkan oleh mutasi gen *RET* (Alves *et al.*, 2013; Tjaden & Trainor, 2013). Namun, penetrasi gen *RET* pada pria 72% dan wanita 51% (Amiel & Lyonnet, 2001).

Berdasarkan penelitian Chin *et al.* (2008) pada populasi Taiwan menunjukkan mutasi *missense* heterozigot gen *RET* pada 2 dari 15 pasien HD. Mutasi yang ditemukan adalah mutasi titik pada ekson 2 dan ekson 3. Berdasarkan penelitian Ruiz-Ferrer *et al.* (2006) ditemukan mutasi pada exon/intron 4 berupa mutasi *missense*. Berdasarkan penelitian Nunez-Torres *et al* (2011) ditemukan mutasi pada exon/intron 2. Berdasarkan penelitian Jiang *et al* (2019) ditemukan mutasi *missense* pada exon 2 dan 4 serta ditemukan mutasi *frameshift* pada exon 4.

Berdasarkan penelitian Iskandar (2019) di Yogyakarta, *RET* rs2506030 adalah alel kerentanan umum dalam kasus HD Indonesia. Frekuensi populasi alel risiko (G) di Indonesia (kontrol) (0,67) sebanding dengan penelitian lain dari kasus keturunan Asia (Li, 2017; Yang, 2017) tetapi lebih tinggi dari kelompok etnis Afrika (0,09) dan Eropa (0,39). Dengan demikian, alel ini mungkin menjadi kontributor kuat terhadap insiden HD yang lebih tinggi di Indonesia daripada di Afrika atau Eropa (Iskandar, 2019).

Menurut data Rumah Sakit RSUP Dr. M. Djamil Padang, rumah sakit rujukan di Sumatera Barat terdapat 73 kasus HD dalam 2 tahun terakhir. Namun, belum ada penelitian tentang mutasi pada gen *RET* pada pasien di Sumatera Barat. Informasi ini penting untuk mengetahui apakah mutasi yang terjadi sama dengan daerah di Indonesia dan negara lainnya.

Mutasi dapat dilacak dengan teknik *sequencing* (Grada & Weinbrecht, 2013). *DNAsequencing* bertujuan untuk menentukan urutan wilayah kecil yang diminati (~1 kilobase) dan menggunakan produk PCR sebagai *template*. Terdapat beberapa komponen yang dibutuhkan untuk sekuensing DNA, salah satunya adalah primer (Putri, 2019).

Perancangan primer yang baik adalah kunci keberhasilan dalam proses amplifikasi DNA (He *et al.*, 1994). Secara umum, primer yang ideal memiliki panjang antara 18 sampai 30 oligonukleotida (Borah, 2011). Primer yang baik merupakan primer yang memenuhi kriteria parameter primer. Persyaratan umum untuk primer adalah harus memiliki suhu leleh yang sama ( $T_m$ ) dan kandungan G/C yang seimbang, namun harus menghindari *self-complementarity* dan struktur



*hairpin*(Ye *et al.*, 2012). Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan desain primer secara *in silico* dan optimasi PCR pada sampel pasien *hirschsprung's disease*.

### **B. Rumusan Masalah**

1. Bagaimana urutan primer yang spesifik gen *RET*?
2. Bagaimana kondisi optimum metode PCR untuk mengamplifikasi gen *RET*?
3. Bagaimana spesifisitas primer metode PCR dalam mengamplifikasi gen *RET*?

### **C. Tujuan Penelitian**

1. Mendesain primer spesifik gen *RET* dan uji spesifisitas secara *in silico*.
2. Menentukan kondisi PCR yang optimum untuk deteksi gen *RET*.
3. Menguji spesifisitas metode PCR.

### **D. Manfaat Penelitian**

1. Menjadi acuan bagi peneliti untuk mendesain primer gen *RET* pada *hirschsprung's disease*.
2. Sebagai referensi dan dasar untuk penelitian selanjutnya.