

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *RET* EKSON 10  
UNTUK *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE***



**Oleh :  
SILVY RAHMAYANTI  
NIM. 20032038/2020**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2024**

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *RET* EKSON 10  
UNTUK *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE***

**SKRIPSI**

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



**Oleh :  
SILVY RAHMAYANTI  
NIM. 20032038/2020**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2024**

## PERSETUJUAN SKRIPSI

### DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *RET* EKSON 10 UNTUK *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE*

Nama : Silvy Rahmayanti  
NIM : 20032038  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 20 Agustus 2024

Mengetahui:  
Ketua Departemen Biologi

Disetujui Oleh:  
Pembimbing



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.  
NIP. 19750815 200604 2 001



Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si  
NIP. 19690629 199403 2 003

## PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Silvy Rahmayanti  
NIM : 20032038  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

### DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR CEN *RET* EKSON 10 UNTUK *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE*

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

Padang, 20 Agustus 2024

Tim Penguji

Nama

Tanda Tangan

Ketua : Dr. Yuni Ahda, S.Si, M.Si

Anggota : Afifatul Achyar, M.Si

Anggota : Siska Alicia Farma, S.Pd., M.Biomed



## SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Silvy Rahmayanti

NIM : 20032038

Program Studi : Biologi

Departemen : Biologi

Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

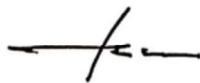
Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya yang dengan judul “Desain Primer dan Optimasi PCR Gen *RET* Ekson 10 untuk *Hirschsprung's Disease*” adalah benar hasil karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat orang lain.

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

Padang, 20 Agustus 2024

Saya yang menyatakan

Mengetahui:  
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.  
NIP. 19750815 200604 2 001



Silvy Rahmayanti  
NIM. 20032038

# Desain Primer dan Optimasi PCR Gen *RET* Ekson 10 Untuk *Hirschsprung Disease*

Silvy Rahmayanti

## ABSTRAK

*Hirschsprung Disease* (HD) merupakan suatu gangguan pada perkembangan dari sistem saraf enterik memiliki karakteristik tidak adanya sel ganglion di submukosa dan pada dinding saluran pencernaan. Mutasi gen *RET* merupakan kejadian yang paling umum dari penyakit *Hirschsprung*. Desain primer pada ekson 10 gen *RET* dengan *RefSeq* NM\_020975.3. Namun *RefSeq* yang digunakan merujuk kepada mRNA *RET* pada pasien HD dengan kombinasi *multiple endocrine neoplasia* (MEN) dan *medullary thyroid carcinoma* (MTC). Oleh karena itu perlu dilakukan desain primer baru sesuai dengan *refseq representative genomes* yang baik untuk amplifikasi gen. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan desain primer secara *in silico* dan optimasi suhu *annealing* untuk amplifikasi gen *RET* pada ekson 10.

Jenis penelitian ini merupakan penelitian deksriptif dan dilakukan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang dari bulan Juli 2023 – Februari 2024. Primer didesain menggunakan aplikasi *Geneious Prime*. Selanjutnya kandidat primer dipilih sesuai dengan kriteria parameter primer yang baik. Untuk memperoleh suhu *annealing* yang optimal dilakukan amplifikasi menggunakan *gradient PCR*.

Hasil dari penelitian ini diperoleh primer yang dibuat menggunakan *Geneious Prime* menghasilkan primer terbaik yaitu primer *forward* 5'-AACACAGCGAGACTCCATCA-3' dan *reverse* 5'-TGGCTACACGGACACTAAACC-3' yang menghasilkan amplicon berukuran 737 bp. Dan secara spesifik mengamplifikasi gen *RET* berdasarkan hasil uji spesifisitas secara *in silico*. Suhu *annealing* yang optimum untuk amplifikasi gen *RET* adalah 56,5°C.

**Kata kunci** : Desain Primer, Gen *RET*, Optimasi Suhu *Annealing*

# Primer Design and PCR Optimization of RET Exon 10 Gene for Hirschsprung Disease

Silvy Rahmayanti

## ABSTRACT

Hirschsprung Disease (HD) is a developmental disorder of the enteric nervous system characterized by the absence of ganglion cells in the submucosa and wall of the gastrointestinal tract. RET gene mutations are the most common occurrence of Hirschsprung disease. Primer design on exon 10 of the RET gene with RefSeq NM\_020975.3. However, the RefSeq used refers to RET mRNA in HD patients with a combination of multiple endocrine neoplasia (MEN) and medullary thyroid carcinoma (MTC). Therefore, it is necessary to design new primers according to refseq representative genomes that are good for gene amplification. This study aims to perform in silico primer design and annealing temperature optimization for RET gene amplification in exon 10.

This type of research is descriptive research and was conducted at the Genetics and Biotechnology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padang State University from July 2023 - February 2024. Primer was designed using Geneious Prime application. Furthermore, primer candidates were selected according to the criteria of good primer parameters. To obtain the optimal annealing temperature, amplification was carried out using gradient PCR.

The results of this study obtained primers made using Geneious Prime produced the best primer, namely forward primer 5'-AACACAGCGAGACTCCATCA-3' and reverse 5'-TGGCTACACGGACTAAACC-3' which produced amplicons measuring 737 bp. And specifically amplified the RET gene based on the results of the in silico specificity test. The optimum annealing temperature for RET gene amplification is 56.5°C.

**Keywords :** Primer Design, RET Gene, Annealing Temperature Optimization.

## KATA PENGANTAR



Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT Sang Maha. Segalanya, atas seluruh curahan rahmat dan hidayatNya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN RET EKSON 10 UNTUK *HIRSCHSPRUNG’S DISEASE***” ini tepat pada waktunya. Skripsi ini ditulis dalam rangka memenuhi syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Dalam penyelesaian studi dan penulisan skripsi ini, penulis banyak memperoleh bantuan baik pengajaran, bimbingan dan arahan dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Untuk itu penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Ibu Dr. Yuni Ahda, S. Si., M. Si. sebagai Pembimbing atas kepercayaan, bimbingan dan saran selama proses penelitian dan pembuatan skripsi ini.
2. Ibu Afifatul Achyar, M. Si. sebagai Dosen Penguji I yang telah memberikan kritik dan saran, serta waktu dan tenaga dalam proses penelitian.
3. Ibu Siska Alicia farma, S.Pd., M.Biomed. sebagai Dosen Penguji II atas saran, nasehat dan bimbingan selama proses penelitian.
4. Ibu Dr. Resti Fevria, S.TP., M.P. selaku pembimbing akademik yang selalu memberikan nasehat dan saran selama di Departemen Biologi.
5. Bapak/ ibu staf pegawai Departemen Biologi, Universitas Negeri Padang.



6. Kedua Orang Tua saya Bapak Kaneldi dan Ibu Endra Yanti yang selalu memberikan do'a dan dukungan kepada penulis selama ini.
7. Kakak dan adik tercinta saya yang selalu memberikan doa dan dukungannya selama ini.
8. Semua teman-teman saya selama kuliah dan penelitian yaitu, kia, hana, ana, salsa. Terima kasih telah menemani dan memberikan semangat selama menjalankan masa perkuliahan dan penelitian ini dan tidak pernah henti saling memberikan semangat.
9. Teman-teman Biologi Sains 2020 yang selalu memberikan dukungan serta do'anya.

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, Mei 2024

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>ABSTRAK</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	v
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	ix
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
A. <i>Hirschsprung's Disease</i> (HD).....	6
B. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	9
C. Primer .....	11
D. Elektroforesis .....	12
E. <i>Sequencing</i> .....	14
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	16
A. Jenis Penelitian.....	16
B. Waktu dan Tempat Penelitian .....	16
C. Alat dan Bahan .....	16
D. Prosedur Penelitian.....	17
E. Teknik Analisis Data.....	22

<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>23</b>
A. Hasil .....	23
B. Pembahasan.....	27
<b>BAB V. PENUTUP.....</b>	<b>32</b>
A. Kesimpulan .....	32
B. Saran.....	32
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>38</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Macam-macam Mutasi yang Terjadi pada Gen <i>RET</i> .....	9
2. Komponen PCR .....	21
3. Tahapan PCR .....	21
4. Karakteristik Hasil Desain Primer Gen <i>RET</i> .....	23

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ciri – ciri <i>Hirschsprung's Disease</i> .....	7
2. Desain Primer pada sekuen <i>RET</i> .....	23
3. Hasil <i>Primer-BLAST</i> .....	23
4. Hasil Elektroforesis <i>Gradient PCR</i> .....	25
5. Hasil <i>BLAST NCBI (Description and Alignments)</i> .....	25

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kandidat Primer Gen <i>RET</i> .....	35
2. Hasil kemurnian dan konsentrasi DNA sampel manusia yang tidak terindikasi penyakit <i>Hirschsprung</i> .....	35
3. Desain primer gen <i>RET</i> .....	36

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

*Hirschsprung Disease* (HD) merupakan suatu gangguan pada perkembangan dari sistem saraf enterik memiliki karakteristik tidak adanya sel ganglion di submukosa dan pada dinding saluran pencernaan, yang diawali dari bagian distal yaitu anorektal, memanjang ke arah proksimal dengan panjang segmen aganglionosis bervariasi (Permata Warastri Dewi & Krisnuhoni, 2023). HD biasanya terjadi sekitar 1 dari 5000 kelahiran hidup yang ditandai dengan tidak adanya sel ganglion di pleksus mukosa dan submukosa usus bagian distal. Kurangnya gerakan peristaltik pada usus menyebabkan obstruksi usus fungsional. Pada kasus aganglionosis yang melibatkan daerah rektosigmoid, dapat menyebarkan ke area lain. 5-10% kasus dapat melibatkan seluruh usus besar atau bahkan sejumlah besar usus kecil (Langer & Levitt, 2020).

Perkembangan HD merupakan proses kompleks yang dipengaruhi oleh berbagai faktor, dengan 20% kasus HD bersifat familial, sedangkan sisanya bersifat sporadis. Kasus HD dapat dipengaruhi oleh berbagai gen, 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)* termasuk di antara setidaknya 20 gen yang diketahui terlibat dalam patofisiologi dari HD.

Gen-gen ini mengkode faktor transkripsi, ligan, dan reseptor. Berdasarkan beberapa penelitian diketahui bahwa *RET* merupakan gen yang paling umum dari penyakit HD, sedangkan gen lainnya yang diketahui hanya memberikan kontribusi yang kecil, yaitu 30% dari semua kasus HD (Diposarosa *et al.*, 2021).

Gen *RET* yang memiliki 21 ekson ditemukan pada kromosom 10q11.2 (Sharma & Saranath, 2011). Berdasarkan penelitian Fanis *et al.* (2018) sebagian besar mutasi yang mempengaruhi *proto-oncogene RET* ditemukan pada ekson 2, 4, 6, 10, 11, 13, 14, 15, dan 16. Mutasi *RET* dari sebagian keluarga ditemukan hingga 50% dan dalam 15-30% dari kasus HD sporadis (So *et al.*, 2011). Mutasi *RET* menunjukkan manifestasi fenotipik 45-51% pada wanita dan 65-72% pada pria yang diketahui penetrasi tidak lengkap untuk HD (Nerakh, 2019).

Berdasarkan beberapa penelitian pada pasien HD ditemukan berbagai mutasi pada gen *RET*. Berdasarkan penelitian Sharma & Saranath (2011) terjadi mutasi di gen *RET* pada 9 dari 15 pasien. Mutasi yang ditemukan merupakan mutasi *missense* pada ekson 10 (kodon 609 dan 618). Berdasarkan penelitian Zarif Yeganeh *et al.* (2015) terjadi mutasi ekson 10. Mutasi yang terjadi berupa mutasi *missense*. Mutasi *missense* juga ditemukan pada penelitian Hum (1999) pada ekson 10. Sedangkan pada penelitian Núñez-Torres *et al.* (2011) ditemukan mutasi *germline* pada ekson 6. Berdasarkan data RSUP Dr. M. Djamil Padang sebagai rumah sakit rujukan di Sumatera Barat terdapat 265 kasus penyakit *Hirschsprung* pada tahun 2021- 2023.

Untuk mengidentifikasi mutasi pada DNA, diperlukan rancangan primer yang baik untuk amplifikasi DNA dan sekuensing (Melati *et al.*, 2022). Perancangan primer adalah langkah pertama dalam mengamplifikasi dan menganalisis segmen



DNA (Fakih *et al.*, 2021). Pada penelitian Aulia *et al.*, (2023) telah melakukan desain primer pada ekson 2 dan ekson 4 gen *RET* (*Accession number*: NG\_007489). Penelitian ini berhasil merancang primer spesifik gen *RET* yang menghasilkan daerah yang teramplifikasi berukuran 632 *base pair* pada ekson 2 dan 784 *base pair* pada ekson 4.

Pada penelitian Ruiz-Ferrer *et al.*, (2006) telah dilakukan desain primer pada ekson 10 gen *RET* dengan RefSeq NM\_020975.3. Namun RefSeq yang digunakan merujuk kepada mRNA *RET* pada pasien HD dengan kombinasi *multiple endocrine neoplasia* (MEN) dan *medullary thyroid carcinoma* (MTC). Mutasi pada HD terdeteksi dalam domain ekstraseluler *RET* yang mempengaruhi fosforilasi protein, pembelahan sel, dan transportasi intraseluler ke membran plasma. Oleh karena itu perlu dilakukan desain primer baru sesuai dengan refseq representative genomes. Ukuran primer yang baik yaitu memiliki panjang nukleotida 18-22 basa, memiliki suhu *Melting temperature* ( $T_m$ ) 52-58°C (Badriyya & Achyar, 2022).

Primer yang baik memiliki selisih  $T_m$  sekitar 5°C. Syarat lain untuk primer yang baik antara lain memiliki *self 3' complementarity* yang rendah untuk mencegah penempelan antar pasangan primer dan membentuk struktur yang disebut *hairpin* (Saraswati & Dwi Wahyuni, 2019).

Desain primer dibuat untuk menyediakan primer yang dapat digunakan dalam reaksi berantai polymerase (PCR) untuk mengamplifikasi DNA (Pradnyaniti *et al.*, 2013). Primer berfungsi sebagai pembatas sekuen DNA target yang akan diamplifikasikan (Vaniana & Putri, 2019). Sepasang primer oligonukleotida yaitu

primer *forward* dan primer *reverse* menempel pada DNA target dalam proses *annealing* (Fakih *et al.*, 2021).

Suhu *annealing* adalah suhu yang berpengaruh pada proses penempelan primer ke dalam *template* DNA. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi, maka tidak akan terjadi penempelan primer pada *template* dengan baik yang ditandai dengan semakin tipisnya band yang terbentuk sebaliknya, jika suhu *annealing* terlalu rendah, akan terjadi penempelan primer pada situs yang tidak spesifik, yang pada akhirnya akan mengakibatkan teramplifikasinya fragmen lokus yang tidak diinginkan (Pertiwi *et al.*, 2010). Optimasi PCR dilakukan pada sampel DNA manusia yang tidak terindikasi penyakit *Hirschsprung*. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan desain primer secara *in silico* dan optimasi PCR pada sampel DNA manusia non *Hirschsprung Disease*.

## **B. Rumusan Masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana sekuen primer yang spesifik untuk amplifikasi ekson 10 gen *RET*?
2. Bagaimana kondisi optimum PCR untuk amplifikasi ekson 10 gen *RET*?

## **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Memperoleh primer spesifik untuk amplifikasi ekson 10 pada gen *RET* dan uji spesifisitas secara *in silico*.
2. Mengetahui kondisi PCR yang optimum untuk amplifikasi ekson 10 pada gen *RET*.

#### **D. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan primer yang dapat digunakan dalam menganalisis mutasi pada ekson 10 gen *RET* untuk penelitian selanjutnya
2. Menjadi acuan bagi peneliti berikutnya dalam mendesain primer untuk amplifikasi DNA target.