

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *EDNRB* EKSON
2 DAN 3 UNTUK ANALISIS MUTASI GEN PADA
*HIRSCHSPRUNG DISEASE***



**ANISA FITRI
NIM.21032045/2021**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2025**

**DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *EDNRB* EKSON
2 DAN 3 UNTUK ANALISIS MUTASI GEN PADA
*HIRSCHSPRUNG DISEASE***

SKRIPSI

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



**OLEH:
ANISA FITRI
NIM.21032045/2021**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2025**

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Anisa Fitri
NIM : 21032045/2021
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *EDNRB* EKSON 2 DAN 3 UNTUK ANALISIS MUTASI GEN PADA *HIRSCHSPRUNG DISEASE*

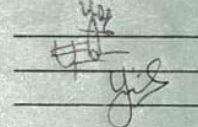
*Dinyatakan Lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang*

Padang, 23 September 2025

Tim Penguji

	Nama
Ketua	: Prof. Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si
Anggota	: Afifatul Achyar, S.Si., M.Si
Anggota	: Yusni Atifah, S.Si., M.Si

Tanda tangan



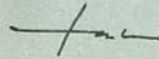
PERSETUJUAN SKRIPSI

DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *EDNRB* EKSON 2 DAN 3 UNTUK ANALISIS MUTASI GEN PADA *HIRSCHSPRUNG DISEASE*

Nama : Anisa Fitri
NIM : 21032045/2021
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 23 September 2025

Mengetahui:
Ketua Departemen Biologi



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

Disetujui Oleh:
Pembimbing



Prof. Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si
NIP. 196906291994032003

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anisa Fitri
NIM : 21032045/2021
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul “Desain Primer dan Optimasi PCR Gen *EDNRB* Ekson 2 dan 3 Untuk Analisis Mutasi Gen pada *Hirschsprung Disease*” adalah benar merupakan karya sendiri, bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya 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, 23 September 2025

Diketahui oleh,
Ketua Departemen Biologi



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

Saya yang menyatakan,



Anisa Fitri
NIM. 21032045

DESAIN PRIMER DAN OPTIMASI PCR GEN *EDNRB* EKSON 2 DAN 3 UNTUK ANALISIS MUTASI GEN PADA *HIRSCHSPRUNG DISEASE*

Anisa Fitri

ABSTRAK

Hirschsprung Disease (HD) adalah suatu gangguan pada perkembangan dari sistem saraf enterik yang mempunyai karakteristik tidak adanya sel ganglion di submukosa dan pada dinding saluran pencernaan. Gen reseptor *endothelin type B* (*EDNRB*) adalah gen kedua yang paling banyak mengalami mutasi setelah *RET* dalam HD. Gen *EDNRB* terletak pada kromosom 13q22. Gen ini memiliki panjang 24 kilobasa dan terdiri dari 7 ekson dan 6 intron. Gen *EDNRB* mengkode sub tipe reseptor berpasangan protein G, yang memiliki peran penting untuk perkembangan neuron enterik dan melanosit epidermis. Untuk mendapatkan hasil PCR yang akurat, diperlukan desain primer yang tepat dan spesifik. Penelitian ini bertujuan melakukan desain primer dan menentukan kondisi PCR optimum untuk amplifikasi gen *EDNRB* pada ekson 2 dan 3.

Jenis penelitian ini adalah deskriptif yaitu memberi gambaran atau deskripsi mengenai desain primer gen *EDNRB* ekson 2 dan 3 serta optimasi PCR. Penelitian dilakukan pada bulan Maret - Mei 2025 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Desain primer dilakukan dengan menggunakan program *Geneious Prime*. DNA diisolasi dari sampel darah manusia yang tidak terindikasi penyakit *hirschsprung* dan dilakukan optimasi suhu *annealing* serta optimasi konsentrasi primer.

Penelitian ini berhasil mendesain sepasang primer dengan urutan nukleotida pada primer *forward* 5'-GGC TCA AGT TTG CTC TGA TG-3' dan primer *reverse* 5'-GGA CCT GGT TTA TCT ATG CC-3'. Primer yang telah didesain memenuhi kriteria primer yang ideal, yaitu memiliki panjang basa 20 bp, %GC 50%, nilai *melting temperature* pada primer *forward* 57.1°C dan pada primer *reverse* 55.3°C dengan selisih *Tm* 1.8°C, serta tidak memiliki *Hairpin* dan *self-dimer*. Berdasarkan uji spesifisitas secara *in silico* diketahui primer secara spesifik mengamplifikasi ekson 2 dan ekson 3 gen *EDNRB* dengan menghasilkan ampikon 966 bp. Suhu *annealing* yang optimum adalah 55,3°C. Konsentrasi primer yang optimum adalah 1,1 µM.

Kata kunci: Desain primer, gen *EDNRB*, HD, optimasi PCR

PRIMER DESIGN AND PCR OPTIMIZATION OF *EDNRB* GENE EXON 2 AND 3 FOR GENE MUTATION ANALYSIS IN *HIRSCHSPRUNG DISEASE*

Anisa Fitri

ABSTRACT

Hirschsprung Disease (HD) is a disorder of the development of the enteric nervous system characterized by the absence of ganglion cells in the submucosa and in the walls of the digestive tract. The endothelin receptor type B (*EDNRB*) gene is the second most frequently mutated gene after *RET* in HD. The *EDNRB* gene is located on chromosome 13q22. This gene is 24 kilobases in length and consists of 7 exons and 6 introns. The *EDNRB* gene encodes a G protein-coupled receptor subtype, which plays a crucial role in the development of enteric neurons and epidermal melanocytes. To obtain accurate PCR results, precise and specific primer design is essential. This study aims to design primers and determine the optimal PCR conditions for amplifying the *EDNRB* gene in exons 2 and 3.

This type of research is descriptive, providing an overview or description of the primer design for *EDNRB* gene exons 2 and 3, as well as PCR optimization. The study was conducted from March to May 2025 at the Genetics and Biotechnology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Padang. Primer design was performed using the *Geneious Prime* program. DNA was isolated from humans without *Hirschsprung's disease*, and annealing temperature optimization and primer concentration optimization were conducted.

This study successfully designed a pair of primers with nucleotide sequences in the forward primer 5'-GGC TCA AGT TTG CTC TGA TG-3' and reverse primer 5'-GGA CCT GGT TTA TCT ATG CC-3'. Based on in silico specificity testing, it is known that the primer specifically amplifies exon 2 and exon 3 of the *EDNRB* gene, producing a 966 bp amplicon. The optimal annealing temperature is 55.3°C. The optimal primer concentration is 1.1 µM.

Keyword: primer design, *EDNRB* gene, HD, PCR optimization

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya dan tidak lupa sholawat serta salam kepada Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan skripsi yang berjudul “**Desain Primer dan Optimasi PCR Gen *EDNRB* Ekson 2 dan 3 Untuk Analisis Mutasi Gen pada *Hirschsprung Disease***”.

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. Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing akademik dan dosen pembimbing skripsi yang dengan sabar memberikan arahan, bimbingan, saran serta support selama penelitian hingga pengerjaan skripsi ini sampai selesai.
2. Ibu Afifatul Achyar, S.Si., M.Si dan Ibu Yusni Atifah, S.Si., M.Si sebagai dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan dalam penulisan skripsi.
3. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed selaku Ketua Departemen Biologi dan Ketua Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang yang telah memberikan dukungan dan saran di Departemen Biologi.
4. Bapak/Ibu dosen dan staf tata usaha yang telah membantu selama perkuliahan berlangsung di Departemen Biologi.

5. Kedua orang tua ku tercinta. Cinta pertama dan panutanku, Ayahanda Masra, S.Pd dan pintu surgaku Umi Jasmaneli. Terima kasih atas setiap tetes keringat dalam setiap langkah pengorbanan dan kerja keras yang dilakukan untuk memberikan yang terbaik kepada penulis, mengusahakan segala kebutuhan penulis, mendidik, membimbing, selalu memberikan kasih sayang yang tulus serta mendoakan penulis dalam keadaan apapun agar penulis mampu bertahan dalam meraih mimpi di masa depan. Terima kasih selalu berada di sisi penulis dan menjadi alasan bagi penulis dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini hingga memperoleh gelar Sarjana Sains. Ayah, Umi, putri tunggalmu sudah dewasa dan siap melanjutkan mimpi yang lebih tinggi lagi.
6. Sepupu penulis, Rifda Hayati, S.Si, Siti Hafifah dan saudara-saudara penulis dari keluarga Ayah dan keluarga Umi yang selalu menemani penulis dalam keadaan apapun.
7. Pemilik NIM 21086203 yang sudah menemani penulis pada hari-hari yang tidak mudah selama proses pengerjaan skripsi ini. Terima kasih telah menjadi sosok yang selalu memberikan semangat, dukungan dan mendengarkan segala keluhan penulis. Semoga kita bisa sukses bersama sesuai dengan apa yang kita impikan.
8. Sahabat penulis Della Trya Monica, Septiasri Anggun, Divia Yuda Meisya, Nur Anisa Wahyuni, Tesya Wulandari, Adinda Rizky Maulina dan Miftahul Jannah yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis dari maba sampai akhir semester. *See you on top, guys!*

9. Sahabat penulis Safirda Cahya Utami, Putri Chairun Nasya, Yonithri Sherlyna dan Agung Pranata yang sudah menemani penulis dari bangku SMA sampai saat ini.
10. Teman-teman penelitian, Septiasri Anggun, Divia Yuda Meisya, Nurul Hidayah dan Nur Anisa Wahyuni yang telah memberikan bantuan, dukungan dan kerjasamanya selama penelitian.
11. Terakhir, kepada pemilik NIM 21032045 yaitu sang penulis, diri saya sendiri, Anisa Fitri. Seorang anak tunggal yang berusia 22 tahun. Terima kasih sudah bertahan sejauh ini, terima kasih sudah memilih berusaha dan merayakan diri sendiri sampai di titik ini walaupun terkadang merasa putus asa, terima kasih karena selalu memutuskan untuk tidak ada kata menyerah sesulit apapun hal yang dijalani. Berbahagialah selalu dimanapun berada! ICA, perjalanan ke depan masih panjang, akan ada banyak rintangan dan proses yang dihadapi, apapun kekurangan dan kelebihanmu, mari selalu merayakan diri sendiri.

Semoga bantuan Bapak/Ibu serta rekan-rekan yang telah diberikan kepada penulis dapat menjadi nilai ibadah dari Allah SWT. Semoga skripsi ini dapat menambah pengetahuan bagi yang membacanya.

Padang, 31 Mei 2025

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vi
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. <i>Hirschsprungs Disease</i> (HD)	5
B. <i>Endothelin Receptor Type B</i> (EDNRB)	7
C. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	9
D. Primer	11
E. Elektroforesis	13
BAB III METODOLOGI 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	20
A. Hasil	20
B. Pembahasan	24
BAB V PENUTUP	28
A. Kesimpulan	28
B. Saran	28
DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komponen PCR untuk amplifikasi gen <i>EDNRB</i> ekson 2 dan 3.....	18
2. Tahapan PCR untuk amplifikasi gen <i>EDNRB</i> ekson 2 dan 3.....	18
3. Kandidat Primer Gen <i>EDNRB</i> Ekson 2 dan 3	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Posisi Penempelan Primer pada Gen <i>EDNRB</i>	21
2. Hasil Primer-BLAST ekson 2 dan 3	21
3. Hasil Elektroforesis Gradient PCR. (1) Ladder 100 bp, (2) suhu annealing 54,0°C, (3) 54,7°C, (4) 55,3°C, (5) 56,0°C, (6) 56,7°C	22
4. Hasil Elektroforesis Optimasi Konsentrasi Primer. (1) Ladder 100 bp, (2) konsentrasi 0,5 µM, (3) 0,7 µM, (4) 0,9 µM, (5) 1,1 µM	23
5. Hasil elektroforesis dengan suhu <i>annealing</i> dan konsentrasi primer optimum	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kandidat Primer Gen <i>EDNRB</i> Ekson 2 dan 3	36
2. Hasil Kemurnian dan Konsentrasi Sampel Darah Manusia Non <i>Hirschsprung Disease</i>	37
3. <i>Datasheet</i> Primer Hasil Desain	38

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Hirschsprung Disease (HD) adalah suatu gangguan pada perkembangan dari sistem saraf enterik yang mempunyai karakteristik tidak adanya sel ganglion di submukosa dan pada dinding saluran pencernaan, yang diawali dari bagian distal yaitu anorektal lalu memanjang kearah proksimal dengan panjang segmen aganglionosis bervariasi (Krisnuhoni, 2023). Tidak adanya sel-sel ganglion pada lapisan submukosa dan *pleksus myenteric* pada usus bagian distal merupakan tanda patologis untuk HD. *Hirschsprung Disease* (HD) dikenal juga sebagai megakolon kongenital, yaitu penyebab utama obstruksi usus pada anak-anak. Kasus HD di seluruh dunia terjadi sekitar 1 dari 5000 kelahiran dengan jumlah penderita laki-laki lebih banyak daripada jumlah penderita perempuan dengan perbandingan 4:1 (Zhang *et al.*, 2023). Keberadaan HD sangat bervariasi, di antara kelompok etnis dan angka tertinggi terdapat pada orang Asia yaitu 2,8 dari 10.000 kelahiran hidup (Karim *et al.*, 2021). *World Health Organization* (WHO) memperkirakan sekitar 7% dari seluruh kematian bayi di dunia disebabkan oleh kelainan bawaan (Nuswandi *et al.*, 2024).

Terdapat 20 gen yang telah diidentifikasi terkait dengan HD yaitu *rearranged during transfection* (RET), *glial cel-derived neurotrophic factor* (GDNF), *family receptor alpha 1* (GFR α 1), *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), dan *Sonic Hedgehog* (SHH). Interaksi antara jalur pensinyalan RET/GDNF dan EDNRB/EDN3 telah ditemukan untuk mengatur perkembangan *Enteric*

Nervous System (ENS) di seluruh usus sehingga terbukti adanya interaksi terkoordinasi antara jalur pensinyalan ini. Tiga gen yang berkontribusi besar terhadap patogenesis HD adalah *RET*, *EDNRB*, dan *GDNF* (Diposarosa *et al.*, 2021).

Gen *Rearranged during Transfection* (*RET*) adalah gen utama penyebab HD (Luzón-Toro *et al.*, 2020). Gen *RET* terletak pada kromosom 10 pada lokasi 10q11.2. Gen *RET* terdiri dari 21 ekson dan memiliki panjang sekitar 60 kilobase pair (kb) (Bahrami *et al.*, 2020). Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan desain primer dan PCR pada beberapa ekson dan intron gen *RET*, yaitu ekson-intron 4 (Aulia *et al.*, 2023), ekson-intron 6 (Aprina, 2024) dan ekson-intron 10 (Rahmayanti, 2024). Hasil analisis sekuensing pada ekson-intron 4 ditemukan mutasi pada ekson 4. Jenis mutasi yang ditemukan adalah mutasi substitusi (A→G) pada nukleotida 33.173. Hasil analisis sekuensing pada ekson-intron 6 ditemukan mutasi substitusi pada dua posisi, yaitu nukleotida ke-36.874 (A→T) dan nukleotida ke-37.434 (A→G).

Gen reseptor *endothelin type B* (*EDNRB*) adalah gen kedua yang paling banyak mengalami mutasi setelah *RET* dalam HD (Widowati *et al.*, 2016). Gen *EDNRB* terletak pada kromosom 13q22. Gen ini memiliki panjang 24 kilobase dan terdiri dari 7 ekson dan 6 intron. Gen *EDNRB* mengkode sub tipe reseptor berpasangan protein G, yang memiliki peran penting untuk perkembangan neuron enterik dan melanosit epidermis. *EDNRB* diaktifkan selama proliferasi dan diferensiasi sel (Granström *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2020). Pasien HD memiliki mutasi pada *EDNRB*, *EDN3*, dan *ECEL* pada 5% kasus. Mutasi pada gen *EDNRB* cenderung menyebabkan HD segmen pendek (S-HD) (Diposarosa *et al.*, 2021).

Aganglionosis segmen pendek (S-HD) mempengaruhi rektum dan kolon sigmoid, kasus pada segmen ini terjadi sebanyak 80% (Gui *et al.*, 2013).

Beberapa penelitian sudah mengungkapkan adanya mutasi pada gen *EDNRB*. Penelitian Duan *et al.* (2003) menemukan mutasi gen *EDNRB* pada 2 dari 17 penderita HD. Satu mutan berada di ekson 3, yang lainnya di ekson 6. Kedua mutasi *EDNRB* tersebut ditemukan pada satu HD segmen pendek. Mutasi ini tidak ditemukan pada sampel HD segmen panjang dan kelompok kontrol normal. Penelitian Zhang *et al.* (2007) menemukan mutasi *missense* gen *EDNRB* pada 2 orang laki-laki. Mutasi tersebut ditemukan di ekson 2 pada HD segmen pendek. Syrris *et al.* (1999) mengidentifikasi adanya mutasi baru pada kodon R253X (CGA→TGA, Arg→STOP). Mutasi ini ditemukan pada ekson 3 dan diperkirakan menghasilkan reseptor *endotelin-B* yang terpotong dan tidak berfungsi. Attié *et al.* (1995) menemukan adanya mutasi *missense* homozigot pada kodon A183G (GCC→GGC) di ekson 2 gen *EDNRB* dan Boardman *et al.* (2001) juga menemukan adanya mutasi *missense* pada kodon 186 (GGA→AGA).

Untuk mengidentifikasi mutasi pada DNA, diperlukan rancangan primer yang baik untuk amplifikasi DNA dan sekuensing. Salah satu metode yang digunakan untuk deteksi mutasi adalah PCR-sekuensing (Melati *et al.*, 2022). Untuk mendapatkan hasil PCR-sekuensing yang akurat, diperlukan desain primer yang tepat dan spesifik (Pranata & Ahda, 2022). Desain primer dilakukan untuk memperoleh primer yang akan digunakan dalam amplifikasi DNA dengan metode PCR. Keberhasilan amplifikasi DNA bergantung pada ketepatan primer yang digunakan. Primer yang digunakan dalam proses PCR harus dapat membatasi daerah yang akan diamplifikasi. Primer ini akan berfungsi sebagai pembatas

fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Pradnyaniti *et al.*, 2013). Kandidat primer yang dipilih harus sesuai dengan kriteria parameter primer yang baik. Kriteria primer yang baik harus memenuhi kondisi tertentu yaitu memiliki ukuran 18-22 basa, T_m pada rentang 52°C-58°C, toleransi perbedaan T_m antar primer adalah 3°C-5°C, memiliki %GC 30-60%, dan tidak membentuk *self-dimer* atau *hairpin* (Badriyya & Achyar, 2020). Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian mengenai “Desain Primer dan Optimasi PCR Gen *EDNRB* Ekson 2 dan 3 Untuk Analisis Mutasi Gen pada *Hirschsprung Disease*”.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana sekuen primer yang spesifik untuk amplifikasi ekson 2 dan 3 gen *EDNRB*?
2. Bagaimana kondisi optimum PCR untuk amplifikasi ekson 2 dan 3 gen *EDNRB*?

C. Tujuan Penelitian

1. Mendesain primer spesifik untuk amplifikasi ekson 2 dan 3 pada gen *EDNRB* dan uji spesifisitas secara *in silico*.
2. Mengetahui kondisi PCR yang optimum untuk amplifikasi ekson 2 dan 3 pada gen *EDNRB*.

D. Manfaat Penelitian

1. Menjadi acuan bagi penelitian berikutnya dalam mendesain primer untuk amplifikasi DNA target.
2. Sebagai bahan dasar untuk penelitian selanjutnya.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Sekuen spesifik hasil desain primer *forward* untuk amplifikasi ekson 2 dan 3 gen *EDNRB* adalah 5'-GGC TCA AGT TTG CTC TGA TG-3' primer *reverse* adalah 5'-GGA CCT GGT TTA TCT ATG CC-3' yang menghasilkan ampikon dengan panjang 966 bp.
2. Kondisi PCR yang optimum untuk amplifikasi ekson 2 dan 3 gen *EDNRB* adalah pada suhu *annealing* 55,3°C dan konsentrasi primer 1,1 µM.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu desain primer dan optimasi, disarankan untuk penelitian selanjutnya melihat mutasi yang terjadi pada sampel pasien *Hirschsprung Disease* dengan metode PCR-sequencing.

DAFTAR PUSTAKA

- Amanda, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimasi Suhu Annealing Proses PCR Amplifikasi Gen shv Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–6.
- 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>
- Arai, H., Nakao, K., Takaya, K., Hosoda, K., Ogawa, Y., Nakanishi, S., & Imura, H. (1993). The human endothelin-B receptor gene : Structural organization and chromosomal assignment. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3463–3470. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53717-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53717-0)
- Attié, T., Till, M., Pelet, A., Amiel, J., Edery, P., Boutrand, L., Munnich, A., & Lyonnet, S. (1995). Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Human Molecular Genetics*, 4(12), 2407–2409.
- Aulia, N., Ahda, Y., Achyar, A., & Putri, D. H. (2023). Desain Primer dan Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Gen RET. *BIOSEL (Biology Science and Education): Jurnal Penelitian Science Dan Pendidikan*, 12(1), 70–77.
- Aulia, S. L., Suwignyo, R. A., & Hasmeda, M. (2021). Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 18(1), 44. <https://doi.org/10.31851/sainmatika.v17i3.5805>
- Badriyya, E., & Achyar, A. (2020). Primer Construction to detect SNP rs11196205 Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2) Using Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR to detect Type-2 Diabetes Mellitus. *Bioscience*, 4(2), 151. <https://doi.org/10.24036/0202042108497-0-00>
- Badriyya, E., Achyar, A., & Syamsurizal. (2022). Primer Design of SNP rs4506565 Transcription Factor 7 like 2 (TCF7L2) Gene to Detect Type-2 Diabetes Mellitus . *Proceedings of the 2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy 2021 (ICCSCP 2021)*, 40(Iccscp), 1–6. <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.211105.029>
- Bahrami, R., Shajari, A., Aflatoonian, M., Noorishadkam, M., Akbarian-Bafghi, M. J., Morovati-Sharifabad, M., Heiranizadeh, N., & Neamatzadeh, H. (2020). Association of REarranged during Transfection (RET) c.73 + 9277T > C and c.135G > a Polymorphisms with Susceptibility to Hirschsprung Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal and Pediatric Pathology*, 39(6),

476–490. <https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1672225>

- Bhattarai, C., Poudel, P. P., Ghosh, A., & Kalthur, S. G. (2022). The RET gene encodes RET protein, which triggers intracellular signaling pathways for enteric neurogenesis, and RET mutation results in Hirschsprung's disease. *AIMS Neuroscience*, 9(1), 128–149. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2022008>
- Boardman, J. P., Syrris, P., Holder, S. E., Robertson, N. J., Carter, N., & Lakhoo, K. (2001). A novel mutation in the endothelin B receptor gene in a patient with Shah-Waardenburg syndrome and Down syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 38(9), 646–647.
- Cahyadi, M., Puruhita, Barido, F. H., & Hertanto, B. S. (2018). Specific primer design of mitochondrial 12S rRNA for species identification in raw meats. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012038>
- Chen, W. C., Chang, S. S., Sy, E. D., & Tsai, M. C. (2006). A De Novo novel mutation of the EDNRB gene in a Taiwanese boy with Hirschsprung disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, 105(4), 349–354. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60128-5](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60128-5)
- Diposarosa, R., Bustam, N. A., Sahiratmadja, E., Susanto, P. S., & Sribudiani, Y. (2021). Literature review: enteric nervous system development, genetic and epigenetic regulation in the etiology of Hirschsprung's disease. *Heliyon*, 7(6), e07308. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07308>
- Duan, X. L., Zhang, X. S., & Li, G. W. (2003). Clinical relationship between EDN-3 gene, EDNRB gene and Hirschsprung's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 9(12), 2839–2842. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i12.2839>
- Fakih, T. M., Wijaya, S., & Priani, S. E. (2021). Desain Primer Gen 12S sRNA dari DNA Mitokondria Babi (*Sus scrofa*) secara In Silico sebagai Kandidat Primer dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(3), 316. <https://doi.org/10.25077/jsfk.8.3.316-322.2021>
- Febrianti, T., & Febriyana, D. (2021). Analisis In Silico Primer dan Probe untuk Deteksi *Aspergillus fumigatus* dengan PCR. *Sinasis2 (1)*, 2(1), 170–176.
- Granström, A. L., Markljung, E., Fink, K., Nordenskjöld, E., Nilsson, D., Wester, T., & Nordenskjöld, A. (2014). A novel stop mutation in the EDNRB gene in a family with Hirschsprung's disease associated with Multiple Sclerosis. *Journal of Pediatric Surgery*, 49(4), 622–625. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2013.10.027>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>

- Gui, H., Tang, W. K., So, M. T., Proitsi, P., Sham, P. C., Tam, P. K., Sau-Wai Ngan, E., Cherny, S. S., & Garcia-Barceló, M. M. (2013). RET and NRG1 interplay in Hirschsprung disease. *Human Genetics*, 132(5), 591–600. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1272-9>
- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1), 21–26. <https://doi.org/10.22373/crc.v2i1.3248>
- Karim, A., Akter, M., Aziz, T. T., Hoque, M., Chowdhury, T. K., Imam, M. S., Walid, A., Kabir, M., So, M., Lam, W. Y., Tang, C. S., Wong, K. K., Tam, P. K., Garcia-Barcelo, M., & Banu, T. (2018). Epidemiological characteristics of Hirschsprung's disease (HSCR): Results of a case series of fifty patients from Bangladesh. *Journal of Pediatric Surgery*, 53(10), 1955–1959. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.12.029>
- 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(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.638093>
- Kim, J. H., Yoon, K. O., Kim, H., Kim, J. K., Kim, J. W., Lee, S. K., & Seo, J. M. (2006). New variations of the EDNRB gene and its association with sporadic Hirschsprung's disease in Korea. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(10), 1708–1712. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2006.05.042>
- Klein, M., & Varga, I. (2020). Hirschsprung's disease—recent understanding of embryonic aspects, etiopathogenesis and future treatment avenues. *Medicina (Lithuania)*, 56(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/medicina56110611>
- Kyrklund, K., Sloots, C. E. J., de Blaauw, I., Bjørnland, K., Rolle, U., Cavalieri, D., Francalanci, P., Fusaro, F., Lemli, A., Schwarzer, N., Fascetti-Leon, F., Thapar, N., Johansen, L. S., Berrebi, D., Hugot, J. P., Crétolle, C., Brooks, A. S., Hofstra, R. M., Wester, T., & Pakarinen, M. P. (2020). ERNICA guidelines for the management of rectosigmoid Hirschsprung's disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01362-3>
- Luzón-Toro, B., Villalba-Benito, L., Torroglosa, A., Fernández, R. M., Antiñolo, G., & Borrego, S. (2020). What is new about the genetic background of Hirschsprung disease? *Clinical Genetics*, 97(1), 114–124. <https://doi.org/10.1111/cge.13615>
- Maitriani, L. K. B., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2015). Desain Primer untuk Amplifikasi Fragmen Gen inhA Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Caktra Kimia*, 3(2), 89–95.

- Mardiana, A., Dhanti, K. R., Kurniawan, & Sulistyowati, R. (2023). Optimization of Primary Concentration and Annealing Temperature in Detecting Blaz Gene in Airborne Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Bacteria. *Borneo Journal Of Medical Laboratory Technology*, 6(1), 389–391.
- Mushlih, M. (2019). Biologi molekular, aplikasi dasar di dunia kesehatan. In *UMSIDA Press* (Vol. 1, Issue Agustus).
- Nugraha, F., Roslim, D. I., Ardilla, Y. P., & Herman. (2014). Analisis Sebagian Sekuen Gen pada Padi (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau. *Biosaintifika*, 6(2), 70–79. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v6i2.3102>
- Nugraha, R., Dewi, P. S., & Nurilmala, M. (2022). Evaluation of COI Gene Primer as a Biomarker Traceability using Bioinformatics Abstract. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(1), 67–79. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.36501>
- Nuswandi, D., Efendi, J., & Taufik, R. (2024). Association between functional outcomes with quality of life in Hirschsprung patients after pull trough at Dr. M Djamil General Hospital. *International Journal of Surgery Science*, 8(2), 33–38. <https://doi.org/10.33545/surgery.2024.v8.i2a.1080>
- 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), 127–134. <https://doi.org/10.19106/jmedsci005302202103>
- Pradnyaniti, D., Wirajana, I., & Yowani, S. (2013). Desain Primer secara in silico untuk amplifikasi fragmen Gen rpoB *Mycobacterium tuberculosis* dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal AGRITECH*, 2(3), 124–130. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jfu/article/download/7387/5641>
- Praja, R. K., & Rosalina, R. (2021). Perancangan primer gen lktB pada *Fusobacterium necrophorum* untuk analisis PCR. *Jurnal Sains Dan Teknologi Peternakan*, 2(2), 47–55. <https://doi.org/10.31605/jstp.v2i2.960>
- Purwakasih, D. B., & Achyar, A. (2021). Desain primer dan PCR In Silico untuk deteksi *Shigella* sp. pada sampel air minum isi ulang. *Jurnal Serambi Biologi*, 6(1), 1–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Putra, L. A. G., Yonathan, C. J., Niedhatrata, N. I., Firdaus, M. H. R., & Yoewono, J. R. (2020). A review of the development of Polymerase Chain Reaction technique and its uses in Scientific field. *Stannum: Jurnal Sains Dan Terapan Kimia*, 2(1), 14–30.
- 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 (IJS�)*, 2(1), 15–21. <https://doi.org/10.15642/ijsl.v2i1.1233>

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.

Sawitri, D., Dewangga, V. S., & Qurrohman, M. T. (2024). Detection fimH Gene in The Urine of UTI Patients at The Puskesmas Banyuanyar, as a Marker for The Presence of *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi Tropis*, 24(2), 406–413. <https://doi.org/10.29303/jbt.v24i2.6852>

Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(1), 36. <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>

Sihotang, M. A. E. D., Erwinda, 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. <https://doi.org/10.54384/eruditio.v1i2.82>

Silambi, A., Setyawati, T., & Langitan, A. (2020). Case Report : Hirschsprung Disease. *Jurnal Medical Profession (MedPro)*, 2(1), 36.

Stujanna, E. N., Ningsih, S. S., Avissa, R., Ayu, N. P., Nurussofa, Z., Djuarna, D. J., Latifah, R., & Sukarya, W. S. (2022). Collagen-VI Specific Primer Design Identification in Rats (*Rattus norvegicus*) Pancreas. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 4(1), 60–70. <https://doi.org/10.33086/ijmlst.v4i1.2515>

Syamsidi, A., Aanisah, N., Fiqram, R., & Jultri, I. Al. (2021). Primer Design and Analysis for Detection of mecA gene. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 5(3), 245–253. <https://doi.org/10.25026/jtpc.v5i3.297>

Syrris, P., Carter, N. D., & Patton, M. A. (1999). Novel nonsense mutation of the endothelin-B receptor gene in a family with Waardenburg-Hirschsprung disease. *American Journal of Medical Genetics*, 87(1), 69–71. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19991105\)87:1<69::AID-AJMG14>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19991105)87:1<69::AID-AJMG14>3.0.CO;2-R)

Tang, C. S. man, Li, P., Lai, F. P. L., Fu, A. X., Lau, S. T., So, M. T., Lui, K. N. C., Li, Z., Zhuang, X., Yu, M., Liu, X., Ngo, N. D., Miao, X., Zhang, X., Yi, B., Tang, S., Sun, X., Zhang, F., Liu, H., Ngan, E. S. W. (2018). Identification of Genes Associated With Hirschsprung Disease, Based on Whole-Genome Sequence Analysis, and Potential Effects on Enteric Nervous System Development. *Gastroenterology*, 155(6), 1908-1922.e5.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.09.012>

- Tang, C. S., Sribudiani, Y., Miao, X. P., De Vries, A. R., Burzynski, G., So, M. T., Leon, Y. Y., Yip, B. H., Osinga, J., Hui, K. J. W. S., Verheij, J. B. G. M., Cherny, S. S., Tam, P. K. H., Sham, P. C., Hofstra, R. M. W., & Garcia-Barceló, M. M. (2010). Fine mapping of the 9q31 Hirschsprung's disease locus. *Human Genetics*, 127(6), 675–683. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0813-8>
- Tang, W., Li, B., Tang, J., Liu, K., Qin, J., Wu, W., Geng, Q., Zhang, J., Chen, H., Xu, X., & Xia, Y. (2013). Methylation analysis of EDNRB in human colon tissues of Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International*, 29(7), 683–688. <https://doi.org/10.1007/s00383-013-3308-6>
- Tjan, A. (2021). Radiology Perspective One-Year Study of Hirschsprung Disease. *Folia Medica Indonesiana*, 57(1), 41. <https://doi.org/10.20473/fmi.v57i1.9857>
- von Boyen, G. B. T., Krammer, H. J., Süss, A., Dembowski, C., Ehrenreich, H., & Wedel, T. (2002). Abnormalities of the enteric nervous system in heterozygous endothelin B receptor deficient (spotting lethal) rats resembling intestinal neuronal dysplasia. *Gut*, 51(3), 414–419. <https://doi.org/10.1136/gut.51.3.414>
- Wang, D., Zhu, T., Zhu, L., Ji, C., Zhou, B., Zhang, G., Yin, Q., Yang, H., & Feng, J. (2023). Screening of undernutrition in children with Hirschsprung disease using preoperative anthropometric parameters: A multicenter cross-sectional study. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 47(1), 151–158. <https://doi.org/10.1002/jpen.2440>
- 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>
- Widowati, T., Melhem, S., Patria, S. Y., De Graaf, B. M., Sinke, R. J., Viel, M., Dijkhuis, J., Sadewa, A. H., Purwohardjono, R., Soenarto, Y., Hofstra, R. M. W., & Sribudiani, Y. (2016). RET and EDNRB mutation screening in patients with Hirschsprung disease: Functional studies and its implications for genetic counseling. *European Journal of Human Genetics*, 24(6), 823–829. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.214>
- Wijayana, K. A. (2023). Penyakit Hirschsprung: Sebuah Tinjauan Pustaka Tentang Patofisiologi, Diagnosa, Dan Terapi. *Mandala Of Health*, 16(2), 134. <https://doi.org/10.20884/1.mandala.2023.16.2.9602>
- Yulita, N., Achyar, A., & Putri, D. H. (2023). Primer design and annealing temperature optimization for catalase (CAT) gene amplification in rice (*Oryza sativa* L.). *Jurnal Serambi Biologi*, 8(3), 437–444.
- Zhang, X. N., Zhou, M. N., Qiu, Y. Q., Ding, S. P., Qi, M., & Li, J. C. (2007).

Genetic analysis of RET, EDNRB, and EDN3 genes and three SNPs in MCS + 9.7 in Chinese patients with isolated Hirschsprung disease. *Biochemical Genetics*, 45(7–8), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s10528-007-9093-y>

Zhang, X., Sun, D., Xu, Q., Liu, H., Li, Y., Wang, D., Wang, J., Zhang, Q., Hou, P., Mu, W., Jia, C., & Li, A. (2023). Risk factors for Hirschsprung disease-associated enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Surgery (London, England)*, 109(8), 2509–2524. <https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000000473>