



DESAIN PRIMER GEN *EDNRB* EKSON 4 DAN OPTIMASI PCR UNTUK ANALISIS MUTASI GEN PADA *HIRSCHSPRUNG DISEASE*

Nurul Hidayah*, Universitas Negeri Padang, Indonesia
Yuni Ahda, Universitas Negeri Padang, Indonesia
Afifatul Achyar, Universitas Negeri Padang, Indonesia
Yusni Atifah, Universitas Negeri Padang, Indonesia
*Corresponding author E-mail: nurulhidayah270702@gmail.com

Abstract

EDNRB gene is a gene located on chromosome 13q22, plays a role in the signaling pathway during the development of the ENS intestinal nerves. Mutations in the *EDNRB* gene in humans are associated with Hirschsprung Disease (HD). Mutations in the *EDNRB* gene are the second most common cause after the *RET* gene in cases of HD with a percentage of 5–10%. To detect mutations, PCR products are needed. Primers are one of the basic components of PCR, while optimization of annealing temperature and optimization of primer concentration are factors in the success of primer attachment to the target gene. This study aims to design *EDNRB* exon 4 gene primers and determine the optimum annealing temperature and primer concentration to amplify the *EDNRB* gene. Primer design with Geneious Prime, and good primer criteria are analyzed in silico. Optimization of annealing temperature and primer concentration is carried out with gradient PCR and variations in primer concentration. The results of this study obtained the best primers, namely the forward primer 5'- CAGTAAGTGTGGCCTGAAAG-3' and the reverse primer 5'-GTGGAACCGAAGTGACTAGA-3', which amplified the *EDNRB* gene exon 4. The optimum PCR conditions for amplification of exon 4 of the *EDNRB* gene were at an annealing temperature of 57.2 °C and at a primer concentration of 0.5 µM.

Keywords: *EDNRB* gene, primer design, PCR optimization, and Hirschsprung Disease (HD)

Abstrak

Gen *EDNRB* merupakan gen yang terletak pada kromosom 13q22, berperan dalam jalur pensinyalan saat perkembangan saraf usus ENS. Mutasi gen *EDNRB* pada manusia dikaitkan dengan *Hirschsprung Disease* (HD). Mutasi pada gen *EDNRB* menjadi penyebab terbanyak kedua setelah gen *RET* dalam kasus HD dengan persentase 5–10%. Untuk mendeteksi mutasi diperlukan produk PCR. Primer merupakan salah satu komponen dasar PCR, sedangkan optimasi suhu *annealing* dan optimasi konsentrasi primer merupakan faktor keberhasilan penempelan primer terhadap gen target. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer gen *EDNRB* ekson 4 dan menentukan suhu *annealing* serta konsentrasi primer yang optimum untuk mengamplifikasi gen *EDNRB*. Desain primer dengan *Geneious Prime*, dan dianalisis kriteria primer yang baik secara *in silico*. Optimasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer dilakukan dengan gradient PCR dan variasi konsentrasi primer. Hasil dari penelitian ini, diperoleh primer terbaik yaitu primer *forward* 5'- CAGTAAGTGTGGCCTGAAAG-3' dan primer *reverse* 5'-GTGGAACCGAAGTGACTAGA-3', yang mengamplifikasi gen *EDNRB* ekson 4. Kondisi PCR yang optimum untuk amplifikasi ekson 4 gen *EDNRB* berada pada suhu *annealing* 57,2 °C dan pada konsentrasi primer 0,5 µM.

Kata Kunci: Gen *EDNRB*, desain primer, optimasi PCR, dan *Hirschsprung Disease* (HD)

PENDAHULUAN

Hirschsprung Disease (HD) adalah kelainan bawaan (kongenital) berupa gangguan perkembangan saraf pada saluran pencernaan. Kondisi ini menyebabkan hilangnya sel ganglia (*aganglionic*) di bagian distal usus besar, (Tjan, 2021). *Aganglionic* usus terjadi karena gangguan migrasi *neuroblast* dari sistem saraf enterik atau dikenal juga dengan *Enteric Nervous System* (ENS) selama perkembangan embrio (Setiadi & Haikal, 2021). Kondisi *aganglionic* melemahkan aktivitas peristaltik usus, dan menyebabkan obstruksi (penyumbatan) pada usus besar akibat feses yang menumpuk (Silambi *et al.*, 2020).

Di Indonesia, angka kejadian kasus HD mencapai 3,1 kasus per 10.000 kelahiran hidup (Gunadi *et al.*, 2022). Meskipun kasus HD relatif langka (1:5000 kelahiran hidup), angka mortalitasnya bisa mencapai 80% pada kasus bayi yang tidak cepat ditangani (Kemenkes, 2017). Sebanyak 25% kasus HD disebabkan oleh faktor genetik (*inherited*) dan 70-75% sisanya belum diketahui penyebabnya (sporadik) (Majdawati, 2009; Luzón-Toro *et al.*, 2020).

Terdapat 20 gen berperan dalam patogenesis HD diantaranya, gen *RET*, *GDNF*, *GFRa1*, *NRTN*, *EDNBR*, *ET3*, *ZEB2*, *PHOX2B*, *SOX10*, *IHH*, dan *SHH* (Diposarosa *et al.*, 2021). Mutasi pada gen *EDNBR* menjadi penyebab terbanyak kedua setelah gen *RET* dalam kasus HD (Widowati *et al.*, 2016). Namun, penelitian tentang mutasi gen *EDNBR* pada pasien HD masih sangat sedikit apabila dibandingkan dengan gen *RET*.

Gen *Endothelin Receptor type B* (*EDNBR*) berlokasi pada q22 kromosom 13, terdiri dari 7 ekson dan 6 intron dengan panjang sekitar 24 kilo base pair (kb) (Wei *et al.*, 2020). Gen *EDNBR* memberikan instruksi untuk membuat protein yang disebut reseptor endotelin tipe B. Protein ini berinteraksi dengan protein lain yang disebut *endotelins*, untuk mengirimkan informasi dari luar sel ke dalam sel, yang memberi sinyal untuk banyak proses seluler penting (Medline plus, 2022).

Mutasi pada gen *EDNBR* akan mencegah pengiriman sinyal penting untuk perkembangan saraf enterik. Akibatnya, saraf ini tidak terbentuk secara normal selama perkembangan embrio. Kekurangan saraf enterik mencegah feses bergerak melalui usus, yang menyebabkan sembelit parah dan penyumbatan usus (Sergi *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2020).

Penelitian sebelumnya melaporkan ada

beberapa mutasi ekson gen *EDNBR* yang menjadi penyebab HD (Auricchio *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005; Sanchez-Mejias *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian tersebut mutasi pada ekson 4 gen *EDNBR* sering kali teridentifikasi sebagai penyebab HD.

Mutasi dapat diideteksi dengan berbagai metode seperti RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), SSCP (*Single-strand conformation polymorphism*), dan *Sequencing* DNA yang menggunakan produk PCR sebagai *template* (Grada *et al.*, 2013; Mahdieh *et al.*, 2013; Green *et al.*, 2019; Aulia *et al.*, 2023). Salah satu komponen dasar PCR adalah primer. Keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR bergantung pada desain primer yang spesifik (Saraswati *et al.*, 2019).

Kriteria primer yang baik untuk reaksi PCR dengan mempertimbangkan nilai *melting temperature* (T_m), panjang primer, %GC, *secondary structure* (*hairpin & dimer*), dan *specificity* atau keunikan primer (Ramadhanil *et al.*, 2023; Septiasari *et al.*, 2025). Tahapan optimasi PCR diperlukan setelah desain primer dilakukan, gunanya untuk mendapatkan hasil pengujian yang optimal selama PCR. Faktor yang dapat dimodifikasi dalam optimasi PCR yaitu suhu *annealing* dan konsentrasi primer (Setyawati & Zubaidah, 2021; Mardiana *et al.*, 2023).

Dari beberapa referensi yang ada, tidak ditemukan primer yang digunakan peneliti dalam skrining mutasi pada ekson 4. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan desain primer gen *EDNBR* ekson 4 secara *in silico* dan optimasi PCR secara *in vitro* menggunakan sampel manusia normal.

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika Dan Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Dilakukan pada bulann Desember 2024 – April 2025. Primer didesain menggunakan *software Geneious Prime* dengan sekuens gen *EDNBR* (*Accession Number*: NG_011630.3) diunduh dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format *GenBank*. Dilanjutkan dengan pemilihan primer yang memenuhi kriteria primer yang baik.

Kriteria primer yang baik yaitu memiliki panjang nukleotida 18-30 basa (Sasmito *et al.*, 2014; Achyar *et al.*, 2021; Masnaini *et al.*, 2023). Kandungan %GC rentang 40-60%, sedekat

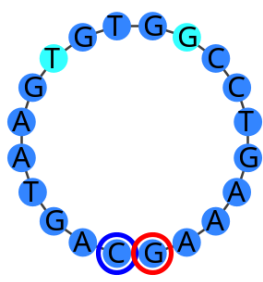
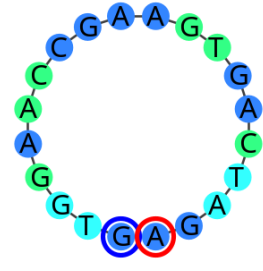
mungkin dengan 50% (Violita *et al.*, 2024). Selisih T_m antar pasangan primer idealnya tidak lebih dari 5°C, biasanya berada dalam rentang 50–60°C (Badriyya & Achyar, 2021; Stujanna *et al.*, 2022). Tidak terdapat *self-dimer* maupun *hairpin*. Primer sebaiknya diakhiri dengan basa G atau C, agar primer tetap stabil (Lorenz, 2012). Tidak terdapat *repeats*, *runs* dan *false priming* (Ramadhanil *et al.*, 2023). Analisis spesifisitas secara *in silico* menggunakan *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) pada situs NCBI.

Penelitian ini menggunakan sampel darah manusia normal. Sebanyak 300 µl darah diisolasi menggunakan Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* dari Promega sesuai instruksi yang tersedia. Sebanyak 50 µl DNA *Rehydration Solution* dimasukkan kedalam pellet DNA untuk direhidrasi. Kemurnian dan konsentrasi sampel DNA diukur dengan alat *NanoPhotometer*. DNA dinyatakan murni apabila nilai rasio *Optical Density* (OD) 260/280 1,8–2,0 (Setiani *et al.*, 2021). Selanjutnya DNA disimpan pada suhu -20°C.

Optimasi suhu *annealing* menggunakan gradient PCR, dilakukan 5 variasi suhu. Setiap *tube* PCR memiliki volume total 10 µL dengan komposisi reaksi terdiri dari PCR *Master Mix* 5

HASIL DAN PEMBAHASANDesain Primer

Tabel 1. Kandidat Primer Ekson 4 Gen *EDNRB*

Karakteristik Primer	DNA Fold
Primer Forward Sekuens : 5'-CAGTAAGTGTGGCCTGAAAG-3' Panjang basa (nt) : 20 Interval : 78.360 -> 78.379 %GC : 50 T_m (°C) : 56,4 T_m <i>Hairpin</i> : None T_m Self-dimer : 3,3 Produk PCR (bp) : 557	
Primer Reverse Sekuens : 5'-GTGGAACCGAAGTGAAGTACTAGA-3' Panjang basa (nt) : 20 Interval : 78.916 -> 78.897 %GC : 50 T_m (°C) : 56,6 T_m <i>Hairpin</i> : None T_m Self-dimer : None Produk PCR (bp): 557	

µL, Primer *EDNRB_E4F* 1 µL, Primer *EDNRB_E4R* 1 µL, *Nuclease Free water* 2 µL, dan DNA *template* 1 µL. Program PCR diatur sebagai berikut: tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit. Sebanyak 35 kali siklus yang terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95°C (30 detik), tahap *annealing* pada gradient suhu (T_m primer $\pm$ 5°C) (30 detik) dan elongasi pada suhu 72°C (1 menit). Elongasi akhir hanya sekali pada suhu 72°C (5 menit).

Optimasi konsentrasi primer dengan variasi konsentrasi primer dimulai dari konsentrasi rendah 0,5 µM; 0,7 µM; 0,9 µM; 1,1 µM. Program PCR diatur sesuai dengan suhu *annealing* yang optimum (Masnaini *et al.*, 2023). Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose 1,5%. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan UVITEC (*Gel Documentation*).

Hasil Elektroforesis dari optimasi suhu *annealing* dan optimasi konsentrasi primer dianalisa dengan membandingkan ketebalan pita (*band*) secara visual. Pita optimal yang dimaksud adalah pita yang tebal, tunggal/*single*, jelas, utuh, tidak *smear*, dan sesuai ukuran target (Setyawati & Zubaidah, 2021; Achyar *et al.*, 2021; Ahda *et al.*, 2021).

Posisi primer harus mengamplifikasi exon 4 yang berada pada urutan basa ke-78.517 hingga 78.666. Karakteristik primer yang dapat dianalisis oleh *Geneious Prime* yaitu nilai %GC, T_m , *hairpin*, *self-dimer*, panjang basa (nt), interval dan ukuran produk PCR. Pasangan primer pada tabel 1 dapat dipilih karena telah memenuhi kriteria primer yang baik, dengan panjang basa ideal 20 nukleotida, nilai T_m primer *forward* dan *reverse* (56,4 °C dan 56,6 °C) dengan selisih T_m 0,2 °C, dan nilai %GC yaitu 50%. Pada primer *reverse* tidak memiliki struktur sekunder (*secondary structure*) sama sekali, sedangkan pada primer *forward* juga tidak terdapat *hairpin* tetapi memiliki 3,3 *self-dimer*, yang dapat ditoleransi.

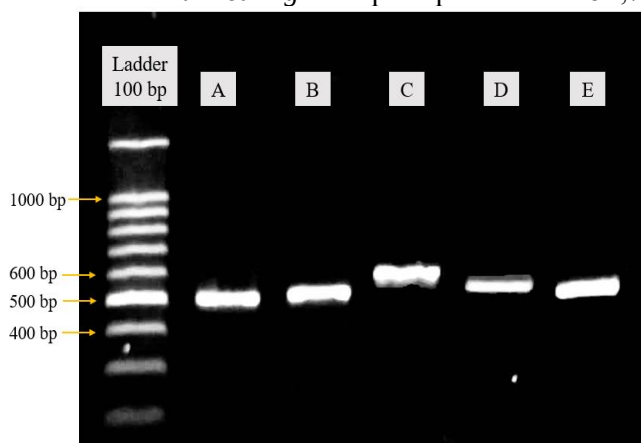
>NG_011630.3 Homo sapiens endothelin receptor type B (EDNRB), RefSeqGene on chromosome 13				
product length = 557				
Forward primer	1	CAGTAAGTGTGGCCTGAAAG	20	
Template	78360		78379	
Reverse primer	1	GTGGAACCGAAGTGACTAGA	20	
Template	78916		78897	

Gambar 1. Hasil *Primer-Blast* Kandidat Primer Terpilih

Uji spesifisitas secara *in silico* terhadap kandidat primer dengan *Primer-BLAST*, dari database *Refseq representative genomes*. Hasilnya menunjukkan bahwa kandidat primer secara spesifik menempel di wilayah gen *EDNRB* pada kromosom 13. Panjang produk PCR 557 bp sesuai dengan panjang produk hasil desain menggunakan *Geneious Prime* (Gambar 1).

Optimasi Suhu *Annealing*

Optimasi suhu *annealing* dilakukan dengan menerapkan metode gradient PCR. Primer *forward* memiliki T_m 56,4 °C dan primer *reverse* memiliki T_m 56,6 °C. Sehingga suhu *annealing* (± 5 °C dari suhu 56,5 °C), sehingga gradient untuk suhu *annealing* ditetapkan pada kisaran 54,7 °C - 57,7 °C.

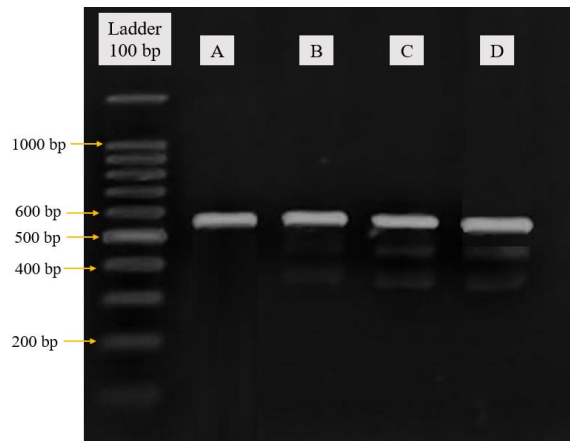


Gambar 2. Hasil Elektroforesis Gradient PCR. Ladder 100 bp, Suhu *Annealing* 54,7 °C (A), 56,0 °C (B), 56,7 °C (C), 57,2 °C (D), dan 57,7 °C.

Dari hasil elektroforesis (Gambar 2) dapat diketahui bahwa suhu *annealing* yang optimum pada suhu 57,2 °C (D), dengan pita tunggal, jelas, dan memiliki amplikon sesuai (557 bp).

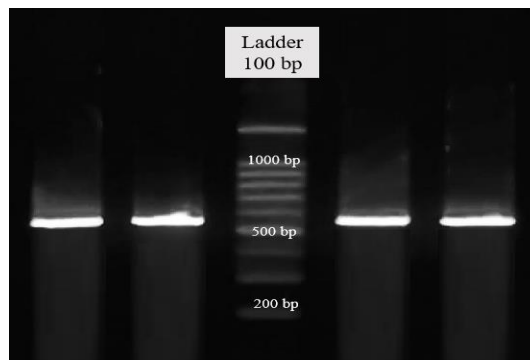
Optimasi Konsentrasi Primer

Variasi konsentrasi primer yang dimulai dari konsentrasi rendah 0,5 μ M; 0,7 μ M; 0,9 μ M; dan 1,1 μ M.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis Optimasi Konsentrasi Primer. *Ladder* 100bp, konsentrasi 0,5 μM (A), konsentrasi 0,7 μM (B), konsentrasi 0,9 μM (C), dan konsentrasi 1,1 μM (D).

Berdasarkan hasil elektroforesis (Gambar 3) konsentrasi primer yang optimum yaitu konsentrasi 0,5 μM (A), dengan ukuran amplicon sesuai (557 bp), pita tunggal yang terlihat jelas dan tebal. Empat pita lain terdapat dimer.



Gambar 4. Hasil Elektroforesis dengan Suhu *Annealing* dan Konsentrasi Primer Optimum.

Proses PCR kembali dilakukan dengan menggabungkan suhu *annealing* optimum dan konsentrasi primer yang optimum sebanyak empat ulangan. Berdasarkan hasil elektroforesis (Gambar 4) terlihat pita pada posisi sejajar dengan ukuran amplicon sama, yaitu 557 bp. Sehingga kondisi optimum benar-benar menghasilkan amplifikasi yang stabil dan bukan hasil kebetulan.

Pembahasan

Dalam melakukan desain primer ekson 4 gen *EDNRB*, hanya diperoleh satu kandidat primer (Tabel 1), primer *forward* dengan sekuens 5'- CAGTAAGTGTGGCCTGAAAG-3' dan primer *reverse* dengan sekuens 5'- GTGGAACCGAAGTGACTAGA-3'. Kandidat primer ini harus memenuhi kriteria primer yang baik agar dapat mengamplifikasi sekuens target secara optimal (Masnaini *et al.*, 2023; Septiasari *et al.*, 2025). Untuk itu analisis parameter dari kandidat primer perlu dilakukan.

Primer yang baik memiliki panjang nukleotida 18-30 basa (Achyar *et al.*, 2021).

Jumlah nukleotida pembentuk primer sangat mempengaruhi proses amplifikasi. Primer dengan panjang nukleotida kurang dari 18 basa cenderung memiliki spesifisitas yang rendah, sebaliknya primer yang lebih dari 30 basa, berpotensi terjadi hibridasi yang akan menghambat proses amplifikasi DNA (Septiasari *et al.*, 2025). Kandidat primer yang diperoleh memiliki panjang nukleotida yang ideal yaitu 20 basa (Tabel 1).

Kandungan %GC merupakan persentase guanin (G) dan sitosin (C) dalam primer. Nilai %GC yang ideal berada pada kisaran 40-60% (Masnaini *et al.*, 2023). Menurut Masnaini (2023), jika primer memiliki %GC yang rendah, efisiensi proses PCR menurun karena primer tidak mampu bersaing secara efektif untuk menempel pada *template* DNA. Sementara itu, jika nilai %GC terlalu tinggi, dapat menyebabkan terbentuknya ikatan yang terlalu kuat antara primer dengan DNA target sehingga produk PCR yang dihasilkan rendah tetapi lebih spesifik.

Kandidat primer memiliki %GC yang ideal yaitu 50%.

Melting Temperature (T_m) yaitu suhu saat primer melakukan disosiasi (melepas ikatan) dengan DNA *template* (Sasmito *et al.*, 2014). Kandidat primer *forward* dan *reverse* memiliki nilai T_m (56,4 °C dan 56,6 °C), dengan selisih (0,2 °C). Idealnya perbedaan nilai T_m antar pasangan primer adalah 0 °C (Chuang *et al.*, 2013). Namun menurut Masnaini (2023) adanya perbedaan nilai T_m masih diperbolehkan dengan syarat selisih T_m tidak boleh lebih dari 5 °C. Nilai T_m perlu diperhatikan karena berhubungan dengan penentuan suhu *annealing* nantinya (Herman *et al.*, 2017).

Tidak memiliki interaksi primer seperti *hairpin* dan *self-dimer*, juga termasuk kriteria primer yang baik (Ramadhanil *et al.*, 2023). Primer yang stabil akan menempel pada sekuens target. *Hairpin* merupakan kondisi di mana primer berikatan dengan dirinya sendiri dan membentuk struktur sekunder, sedangkan *self-dimer* terjadi ketika dua primer yang sama jenisnya, seperti primer *forward* dengan primer *forward* atau primer *reverse* dengan primer *reverse* saling berikatan (Aulia *et al.*, 2023; Masnaini *et al.*, 2023).

Pada kandidat primer (Tabel 1), primer *reverse* tidak ada struktur sekunder (*secondary structure*) sama sekali, sedangkan pada primer *forward* tidak ada *hairpin* tetapi memiliki T_m *self-dimer* 3,3 °C. Hal ini bisa ditoleransi karena T_m *self-dimer* 3,3 °C masih relatif rendah dari T_m kedua primer, sehingga akan mudah terpisah saat proses PCR berlangsung, dan amplifikasi DNA tidak terganggu (Violita *et al.*, 2024). Gambaran pada DNA *Fold* menunjukkan tidak adanya ikatan antar basa nukleotida (Achyar *et al.*, 2021).

Hasil analisis spesifisitas kandidat primer menunjukkan bahwa, primer secara spesifik menempel pada *chromosome* 13 tepatnya pada wilayah gen EDNRB (Gambar 1). Posisi penempelan primer *forward* serta primer *reverse* pada interval 78.360 - 78.379 dan 78.916 - 78.897 serta panjang produk PCR (557 bp) juga sesuai saat didesain pada *Geneious Prime*. Hasil uji ini menunjukkan bahwa primer tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen EDNRB ekson 4 dalam kondisi PCR yang optimal. Berdasarkan kriteria primer ideal yang telah dijabarkan, pasangan primer tersebut telah memenuhi persyaratan primer yang baik sehingga layak untuk dipilih.

Tahapan optimasi PCR diperlukan setelah desain primer, untuk memastikan primer secara spesifik mengamplifikasi gen target yang diinginkan. Ada beberapa faktor yang dapat dimodifikasi dalam optimasi PCR yaitu suhu *annealing* dan konsentrasi primer (Setyawati & Zubaidah, 2021; Mardiana *et al.*, 2023). Tahapan optimasi PCR ini dilakukan untuk setiap gen yang akan di PCR karena kondisi sampel, reagen dan alat-alat yang digunakan setiap laboratorium berbeda-beda (Setyawati & Zubaidah, 2021).

Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk mendapatkan suhu *annealing* yang optimal bagi primer, karena setiap primer memiliki suhu *annealing* (penempelan) yang berbeda-beda (Violita *et al.*, 2024). Suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak menempel dengan baik pada DNA *template*, ditandai dengan semakin tipisnya *band* yang terbentuk. Suhu *annealing* yang rendah menyebabkan primer menempel secara tidak spesifik sehingga fragmen lokus yang tidak diinginkan ikut teramplifikasi (Setyawati & Zubaidah, 2021). Optimasi suhu *annealing* dilakukan secara *in vitro* dengan metode gradient PCR (Achyar *et al.*, 2021).

Berdasarkan hasil elektroforesis dengan gel agarose 1,5%, suhu *annealing* optimum yang mengamplifikasi ekson 4 gen EDNRB dengan pasangan primer EDNRB_E4 adalah 57,2 °C. Pada suhu ini pita yang ditampilkan berupa pita tunggal dan tebal (Ahda *et al.*, 2021) dan ukuran ampikon yang sesuai yaitu 557 bp (Gambar 2). Empat suhu lainnya juga menampilkan pita tunggal dan tebal, tetapi ukuran ampikonnya tidak sesuai dengan ukuran produk PCR yang didesain.

Berdasarkan pada hasil elektroforesis (Gambar 3), konsentrasi primer optimum yang mengamplifikasi ekson 4 gen EDNRB adalah konsentrasi 0,5 μ M. Didasari pada pita tunggal yang tebal serta sesuai dengan ukuran target (Ahda *et al.*, 2021; Mardiana *et al.*, 2023) yaitu 557 bp.

Pada konsentrasi primer 0,7 μ M; 0,9 μ M; dan 1,1 μ M, pita yang dihasilkan bukan pita tunggal karena terdapat dimer dan ukuran produk yang dihasilkan juga tidak sesuai. Konsentrasi primer yang terlalu rendah, bisa menyebabkan tidak adanya amplifikasi dan konsentrasi primer yang terlalu tinggi menyebabkan pembentukan primer dimer (kondisi pita yang terbentuk diikuti oleh pita lain yang tidak spesifik) (Setyawati & Zubaidah, 2021).

SIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini berhasil mendesain primer spesifik ekson 4 gen *EDNRB* yaitu *EDNRB_E4F* 5'- CAGTAAGTGTGGCCTGAAAG-3' dan primer *EDNRB_E4R* 5'- GTGGAACCGAAGTGACTAGA-3' yang menghasilkan ampikon berukuran 557 bp dan secara spesifik mengamplifikasi ekson 4 gen *EDNRB* berdasarkan hasil uji spesifisitas secara *in silico*. Kondisi PCR yang optimum untuk amplifikasi ekson 4 gen *EDNRB* berada pada suhu *annealing* 57,2 °C dan pada konsentrasi primer 0,5 µM.

Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan terkait mutasi yang terjadi pada ekson 4 gen *EDNRB* dengan sampel pasien *Hirschsprung Disease*.

DAFTAR RUJUKAN

- Achyar, A., Putri, A. I., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, *in silico* PCR and optimum annealing temperature for *Escherichia coli* detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52-60.
- Ahda, Y., Pranata, A., & Achyar, A. (2021). The Characteristic of Luciferase cDNA of *Lamprigera* sp. (Lampyridae: Coleoptera). In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1940, No. 1, p. 012074). IOP Publishing.
- 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.
- Auricchio, A., Griseri, P., Carpentieri, M. L., Betsos, N., Staiano, A., Tozzi, A., ... & Ceccherini, I. (1999). Double Heterozygosity for A RET Substitution Interfering with Splicing and An *EDNRB* Missense Mutation in Hirschsprung Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 64(4), 1216-1221.
- Badriyya, E., & Achyar, A. (2021). Primer Design of SNP rs4506565 Transcription Factor 7 like 2 (TCF7L2) Gene to Detect Type-2 Diabetes Mellitus. In *2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy 2021 (ICCSCP 2021)* (pp. 197-202). Atlantis Press.
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., & Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology letters*, 35, 1541-1549.
- 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).
- Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(8), 1-4.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), Pdb-Top095109.
- Gunadi, Kalim, A. S., Marcellus, Budi, N. Y. P., & Iskandar, K. (2022). The impact of NRG1 expressions and methylation on multifactorial Hirschsprung disease. *BMC pediatrics*, 22(1), 216.
- Herman, H., Natalya, L. N., Berampu, S. M., & Roslim, D. I. (2017). Optimasi Suhu Annealing untuk Primer G-Ssr dan Est-Ssr pada Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.). *Dinamika Pertanian*, 33(1), 95-102.
- Kemenkes, 2017. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Penyakit Hirschsprung. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (63), e3998.
- 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.
- Mahdieh, N., & Rabbani, B. (2013). An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. *Iranian Journal of Pediatrics*, 23(4), 375.
- Majdawati, A. (2009). Peran Pemeriksaan Barium Enema Pada Penderita Megacolon Congenital (Hirschsprung Diseases). *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 9(2), 64-72.
- Mardiana, A., Dhanti, K. R., Kurniawan, K., & Sulistyowati, R. (2023). Optimasi Konsentrasi Primer Dan Suhu Annealing Dalam Mendeteksi Gen *Blaz* Pada Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* Di Udara:

- 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), 389-393.
- Masnaini, M., Achyar, A., Chatri, M., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2023). Primer Design and Optimization of PCR Methods for Detecting Mixed Rat Meat in Food. In *Proceedings of the 3rd International Conference on Biology, Science and Education (IcoBioSE 2021)* (Vol. 32, p. 282). Springer Nature.
- Medline plus, 2022. EDNRB Gene. United States government.
<https://medlineplus.gov/genetics/gene/ednrb/#conditions> (di Akses tanggal 12 November 2024).
- Ramadhanil, S., Putri, F. R., & Farma, S. A. (2023). Desain primer dan analisis in silico gen glutathione peroxidase-1 pada Rattus norvegicus. *Tarumanagara Medical Journal*, 5(2), 374-383.
- Sanchez-Mejias, A., Fernández, R. M., Lopez-Alonso, M., Antiñolo, G., & Borrego, S. (2010). New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genetics in Medicine*, 12(1), 39-43.
- 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.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer Pada Polymerase Chain Reaction (PCR) Untuk Sekuensing DNA: Mini Review. In *Seminar Nasional Informatika Medis (Snimed)* (Pp. 93-102).
- Septiasari, N. P. S., Dwijastuti, N. M. S., Handayani, N. S., & Darmayanti, P. D. (2025). Desain primer secara in silico dan optimasi PCR untuk deteksi gen penyandi ovary ecdysteroidogenic hormone (OEH) pada nyamuk Aedes aegypti yang terinfeksi Wolbachia: In silico primer design and PCR optimization for detection of the gene encoding ovary ecdysteroidogenic hormone (OEH) in Aedes aegypti mosquitoes infected with Wolbachia. *Jurnal Entomologi Indonesia*, 22(1), 9-16.
- Sergi, C. M., Caluseriu, O., McColl, H., & Eisenstat, D. D. (2017). Hirschsprung's disease: clinical dysmorphology, genes, micro-RNAs, and future perspectives. *Pediatric research*, 81(1), 177-191.
- Setiadi, Q. H., & Haikal, Z. (2021). Total Colonic Aganglionosis: Dilema Diagnosis dan Dampak Jangka Panjang. *Jurnal Kedokteran*, 10(3), 531-536.
- Setiani, N. A., Tritama, E., & Tresnawulansari, A. (2021). Optimasi Optical Density (Od) Pada Isolasi Genom Salmonella Typhi Menggunakan Genomic Dna Purification Kit. *Jurnal Sains Dan Teknologi Farmasi Indonesia*, 10(1), 35-43.
- 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), 36-40.
- Silambi, A., Setyawati, T., & Langitan, A. (2020). Case report: Hirschsprung disease. *Jurnal Medical Profession (MedPro)*, 2(1), 36-40.
- Stujanna, E. N., Ningsih, S. S., Avisssa, R., Ayu, N. P., Nurussofa, Z., Djuarna, D. J., ... & 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.
- Tjan, A. (2021). Radiology perspective one-year study of Hirschsprung Disease. *Folia Medica Indonesiana*, 57(1), 41-45.
- Violita, V., Achyar, A., Zulyusri, Z., Atifah, Y., Putri, D. H., & Nabilah, R. (2024). Primer Design and Optimization of Annealing Temperature for Gene Amplification GSTL2 on Rice. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 17(2), 377-386.
- 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.

- Widowati, T., Melhem, S., Patria, S. Y., De Graaf, B. M., Sinke, R. J., Viel, M., ... & 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
- Wu, T. T., Tsai, T. W., Chu, C. T., Lee, Z. F., Hung, C. M., Su, C. C., ... & Li, C. (2005). Low RET Mutation Frequency and Polymorphism Analysis of The RET And EDNRB Genes in Patients with Hirschsprung Disease In Taiwan. *Journal Of Human Genetics*, 50(4), 168-174.
- Zheng, Y., Lan, C., Wang, N., Xu, X., Hu, T., Wu, Q., ... & Li, C. (2020). Significant Association of rs2147555 Genetic Polymorphism in the EDNRB Gene with Hirschsprung Disease in Southern Chinese Children. *BioMed Research International*, 2020(1), 5956412.