



Desain Primer Secara *in Silico* Untuk Mengidentifikasi Tikus Dengan Menggunakan Gen Cytochrome Oxidase I

Aulia Zahrani, Intan Mardini, Elfira Rosa Pane*

Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang, Indonesia
*e-mail korespondensi: elfirarosapane_uin@radenfatah.ac.id

Abstract. Consumption of beef in Indonesia as a source of animal protein is increasing, but the population of beef cattle in Indonesia has increased quite slowly. This situation has led to rampant counterfeiting or mixing of beef with other meats, especially rat meat (*Rattus norvegicus*). This study aims to obtain a database of Cytochrome oxidase I genes and to design primers *in silico*, using PCR (Polymerase Chain Reaction) to identify genetically modified rat for halal food ingredients. *Rattus norvegicus* (NC001665.2) mt-COXI gene sequences were obtained from the National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) database. The primer was designed using Bioedit software. Furthermore, several primer candidates were analyzed for specificity of the mt-COX1 gene *in silico* using software Olygo Analyzer, NetPrimer and NCBI BLAST. Primers specific to the mt-COXI gene in rat (*Rattus norvegicus*) were successfully designed with a forward primer sequence of 5'-TGACGAAGGAGGTAGTAA 3'; reverse primer sequence 5'-TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'. This primer can be used to develop a method for detecting rat meat in food using PCR method.

Keyword: *In silico*, primer, *Rattus norvegicus*, mt-COXI

Abstrak. Konsumsi daging sapi di Indonesia sebagai salah satu sumber protein hewani semakin meningkat, akan tetapi populasi sapi potong di Indonesia mengalami peningkatan yang cukup lambat. Keadaan ini menyebabkan maraknya pemalsuan atau pengoplosan daging sapi dengan daging lainnya terutama daging tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan database gen Cytochrome oxidase I dan mendesain primer secara *in silico*, menggunakan PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk mengidentifikasi adanya DNA tikus dalam kehalalan suatu bahan makanan. Sekuens gen mt-COX1 *Rattus norvegicus* (NC001665.2) diperoleh dari pangkalan data National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Primer didesain menggunakan perangkat lunak Bioedit. Beberapa kandidat primer dianalisis spesifisitasnya terhadap gen mt-COX1 secara *in silico* menggunakan perangkat lunak Olygo Analyzer, NetPrimer dan NCBI BLAST. Primer yang spesifik terhadap gen mt-COXI pada tikus (*Rattus norvegicus*) berhasil didesain dengan sekuens primer forward 5'-TGACGAAGGAGGTAGTAA - 3'; sekuen primer reverse 5'-TTCGATCTGTGAGGAGTA -3'. Primer ini dapat dimanfaatkan untuk pengembangan metode deteksi daging tikus pada pangan menggunakan metode PCR.

Kata kunci: *In silico*, primer, *Rattus norvegicus*, mt-COX1

PENDAHULUAN

Konsumsi daging sapi di Indonesia sebagai salah satu sumber protein hewani semakin meningkat, akan tetapi populasi sapi potong di Indonesia mengalami peningkatan yang cukup lambat. Peningkatan konsumsi daging sapi dalam beberapa tahun terakhir



berdampak langsung pada harganya yang menciptakan peluang untuk mendapatkan keuntungan lebih tanpa mempertimbangkan aspek keamanan pangan dan kehalalan. Salah satu penipuan yang mungkin terjadi di pasar daging sapi adalah pemalsuan daging sapi dengan mencampurkan daging yang lebih murah dari spesies lain [1].

Pemalsuan daging atau daging oplosan sudah umum terjadi di Indonesia dan menjadi masalah yang cukup meresahkan bagi masyarakat, khususnya bagi umat Islam, karena daging tikus diharamkan untuk dimakan. Pemalsuan daging dilarang karena melanggar hak konsumen dan aturan keamanan pangan, oleh karena itu diperlukan upaya untuk mengidentifikasi pemalsuan daging secara akurat. Pemalsuan daging sering dilakukan karena produsen tersebut mendapatkan keuntungan yang lebih banyak [1].

Salah satu daging yang dapat digunakan dalam pemalsuan daging sapi yaitu daging tikus (*Rattus norvegicus*), karena tikus sangat mudah diperoleh dan juga merupakan salah satu jenis hama dalam pertanian. Daging tikus memiliki warna merah dan berserat, ketika daging tikus sudah diolah, maka akan sulit untuk dikenali dengan kasat mata. Berdasarkan Permenkes RI No. 1501/Menkes/PerX/2010 daging sapi yang telah terkontaminasi dengan daging tikus dapat menyebabkan *Leptospirosis* atau infeksi bakteri yang berasal dari daging tikus tersebut.

Usaha untuk mendeteksi daging yang terkontaminasi oleh daging tikus sudah dikembangkan sejak puluhan tahun yang lalu. Banyak teknik analisis molekuler diseluruh dunia yang digunakan saat ini, salah satunya adalah teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang paling diterima secara luas [2]. PCR adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* yang melibatkan beberapa siklus, serta terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda pada setiap siklusnya. Prinsip dari teknik PCR yaitu memperbanyak bagian spesifik dengan DNA polimerase yang diinisiasi oleh penempelan dNTP (deoksiribonukleotida trifosfat) dalam reaksi ternal [3].

Gen yang akan digunakan yaitu *Cytochrome oxidase I* karena fragmen *Cytochrome oxidase I* ini sering digunakan sebagai DNA barkoding untuk membedakan spesies hewan. Fragmen *Cytochrome oxidase I* sering terjadi mutasi silent (mutasi yang tidak mengubah fungsi asam amino) akan tetapi *Cytochrome oxidase I* ini jarang mengalami substistusi asam amino. Hal tersebut membuat fragmen *Cytochrome oxidase I* berguna untuk identifikasi keragaman filogenetik evolusi dibawah tingkat spesies. Alasan lain dalam penggunaan gen *Cytochrome oxidase I* ini yaitu sedikitnya perbedaan basa nukleotida yang dijumpai sehingga diharapkan dapat mengidentifikasi spesies tersebut secara akurat [4].

Keberhasilan memperbanyak DNA pada metode PCR sangat tergantung pada primer yang digunakan. Primer merupakan nukleotida pendek yang berukuran 18-30 pb (panjang basa) yang dibutuhkan sebagai titik pelekatan enzim DNA polimerase pada proses pemanjangan DNA suatu gen spesifik (Mese, 2020). Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diperbanyak sekaligus menyediakan gugus hidroksi (OH-) pada ujung 3' yang dibutuhkan untuk proses eksistensi DNA [5]

Primer adalah salah satu komponen yang berperan penting dalam proses PCR. Sepasang primer harus mempunyai karakter yang baik agar dapat menempel pada gen target (Messe, 2020), rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan maksimal sehingga menyebabkan produk PCR tidak spesifik dan atau terbentuk primer dimer [3]. Dalam merancang dan menentukan primer terbaik diperlukan beberapa kriteria yang harus dipenuhi [5], untuk memperoleh primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi pada metode PCR dilakukan secara *in silico*, yaitu merancang primer dengan bantuan suatu program dalam komputer [3].

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan primer dari gen *Cytochrome oxidase I* yang terdapat dalam DNA mitokondria tikus, yang akan digunakan untuk mengidentifikasi



keberadaan DNA tikus pada daging sapi yang dirancang secara *in silico*. Sehingga, hasil rancangan primer tersebut bisa digunakan dalam proses amplifikasi PCR.

METODOLOGI PENELITIAN

Gen *mt-CoI Rattus norvegicus*

Sebagai cetakan untuk mendesain primer, digunakan gen *mt-CoI Rattus norvegicus* (NC_001665.2) yang diperoleh dari National Center of Biotechnology Information (NCBI) pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov.

Desain Primer

Format FASTA gen *mt-CoI Rattus norvegicus* yang diperoleh kemudian diolah dengan software oligoanalyzer pada situs www.oligoevaluator.com untuk mendapatkan kandidat primer. Setelah didapatkan kandidat primer, dilakukan pemilihan primer yang sesuai dengan ketentuan primer yang baik [6]. Adapun karakter primer yang baik yaitu panjang primer, kandungan persen GC, suhu leleh (T_m), GC clamp dan *hairpin*.

Selanjutnya, menganalisis jumlah *run*, *repeat* dan struktur sekunder primer berupa *self dimer* dan *cross dimer* yang terjadi pada kandidat pasangan primer untuk menentukan pasangan primer *final*, analisis ini menggunakan program online Netprimer yang dapat diakses dari http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/A_nalyzePrimer.jsp.

Spesifisitas primer dianalisis secara *in silico* dengan penajaran urutan primer menggunakan Primer-BLAST dan kesamaan nukleotida dianalisis dengan melakukan penajaran urutan nukleotida produk PCR menggunakan Nucleotide-BLAST yang dapat ditemukan di situs <https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain primer adalah tahapan awal untuk amplifikasi DNA, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis sampel menggunakan teknik PCR. Desain primer yang baik dilakukan secara *in silico*, yaitu dengan basis ilmu bioinformatika. Pada penelitian ini, primer yang didesain merupakan primer dari gen *mt-CoI* yang dapat diakses dari GenBank NCBI melalui situs www.ncbi.nlm.nih.gov dengan kode akses NC001665.2. berdasarkan hasil penelusuran data yang diunduh dengan format FASTA, gen *mt-CoI Rattus norvegicus* dapat dilihat pada gambar 1.

Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_001665.2

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NC_001665.2:5323-6867 Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome
ATGCTCGTAAACCGTTGACTCTTTCAACTAACCACAAAGATATCGGAACCCCTACCTATTATTTGGAG
CCTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCTTTAAGTATTCTAATTCGAGCTGAACTAGGACAGCCAGGCGCACT
CCTAGGAGATGACCAAACTATATAATGTCTCATGTCAGCCCATGCATTCTGAATAATTTCTTTATAGTA
ATACCTATAAATTTGGAGGCTTCGGGAAGTACTGTTGACCACTAATAATTTGGAGCCCTGATATAGCAT
TCCACGAATAAATAACATAAGCTTTTGACTGCTTCTCCATCACTTCTACTCCTTTAGCATCCTCCAT
AGTAGAAGCTGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTATATCCCCCTTAGCCGGAACCTAGCCATCTGGA
GCATCGTAGATTAACTATTTTCCCTCACATAGCCGGGGTGTCTTCTATCTTAGGAGCTACAAC
TTATCACCACATCATTAATATAAAACCCCTGCTATAACCAATATCAGACACCTCTCTTTGTATGATC
CGTACTAATTACAGCGTCTACTACTTCTCTCACTGCCAGTATTAGCAGCAGGATCACTATACTCCTT
ACAGACCAGAACTAAATACTACTTTCTTCCAGCCGCTGGAGGTGAGAGCCCAATCTTTATCAACACC
TATTCTGATCTTCGGCCACCAGAAAGTGTACATCTTAATCTTCCAGGGTTTGGAAATTTATTCACATGT
AGTTACCTATTACTTGGAAAAAAGAACCTTCCGATATATAGGTATGGTATGAGCCATAATATCTATT
GGCTTCTAGGATTTATTGTATGAGCACATCACATATTCACAGTATAGGCTAGATGAGACCCGAGCCT
ACTTTACATCTGCCACTATAATATCGCAATTCCTACAGGCGTAAAGTATTGAGTACTGCTGCTACACT
ACATGGAGGAATATCAATGATCCCGCCATATTATGAGCCTTAGGGTTTATCTTCTATTACACAGTA
GGGGCTCAACAGGATGCTACTATCACTCACTCCCTGACATTTGATGATGATGATGATGATGATGATG
TAGCTCACTTCCACTATGTTTATCTATAGGAGCAGTATTGCGCATATAGCTTGGCTTCGTCACCTGATT
CCACATTTCTCAGGCTATACCCATAATGACACATGAGCAAAAGCCCACTTTGCCATTATATTTGAGGT
GTAACATAACTTTCTTCTCAACACTTCTAGGATTAGCAGGATACCTGCTGTTACTCTGATATC
CAGATGCTTACACACATGAAATACAGTCTCTCTATAGGCTCATCTCATCTACCTAGCCGCTCTTGT
AATGATCTTCATGTTTGGAGGCTTCGATCAAAACGAGAGTACTCTCAATTTCTCTACTCTCTCACT
AACCTAGAATGACTGATGATGCTCCACCTACACACATTCGAAAGAACCTTCTATGTAAGTTA
AATAA
```

Gambar 1. full coding sequences gen *mt-CoI Rattus norvegicus*

Pada penelitian ini, diperoleh 5 kandidat primer (*forward* dan *reverse*) secara manual. Kandidat primer kemudian diseleksi untuk mendapatkan pasangan primer yang sesuai dengan karakternya, analisa karakter primer dilakukan menggunakan program *online* yaitu *Oligo analyzer* melalui situs <http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet> . Hasil analisa karakter primer dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kandidat primer forward dari gen mt-Col Rattus norvegicus

No	Sekuen Primer	Bp	Tm (°C)	GC (%)	Posisi pada sekuen	GC Clamp	hairpin	self dimer
1	Forward 1 : 5' TGACGAAGGAGGTAGTAA 3'	18	52,9	44,4	309-326	1	-	-
2	Forward 2 : 5' CTCGGACTCGTCCTTATC 3'	18	57,3	55,6	68-85	1	-	-
3	Forward 3 :5' TGAGGATCCTCTACTGGT 3'	18	54,2	55,0	138-155	2	-	-
4	Forward 4 : 5' AGCTCGACTTGATCCTGT 3'	18	57,4	55,0	114-131	2	-	-
5	Forward 5 : 5' TACAGTAGCAGTGTCGGG 3'	18	57,2	55,6	164-181	4	-	-

Tabel 2 Kandidat primer reverse dari gen mt-Col Rattus norvegicus

No	Sekuen Primer	Bp	Tm (°C)	GC (%)	Posisi pada sekuen	GC Clamp	hairpin	self dimer
1	Reverse 1 : 5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	18	53,7	44,4	640-623	1	-	-
2	Reverse 2 : 5' GGCCGAAGAATCAGAATA 3'	18	57,7	44,4	726-709	1	-	-
3	Reverse 3 :5' GCTAATACTGGCAGTGAG 3'	18	53,1	55,0	616-599	1	-	-
4	Reverse 4 : 5' GATGTACACTTCTGGGTG 3'	18	53,2	55,0	743-726	3	-	-
5	Reverse 5 : 5' CCGAAGAATCAGAATAGG 3'	18	54,6	44,4	724-707	2	-	-

Secara umum, primer yang memiliki panjang antara 18-30 panjang basa adalah primer yang ideal. Panjang ini diharapkan baik untuk dapat menempel pada *template* gen target. Primer yang terlalu pendek dapat mempengaruhi spesifisitas primer, sehingga dapat menempel pada suhu yang tidak diinginkan [3]. Sebaliknya, jika primer terlalu panjang akan mengakibatkan spesifisitas yang lebih tinggi dan mengakibatkan hibridasi dengan primer yang lain, sehingga akan menghambat pembentukan polimerasi DNA [5].

Karakteristik primer kedua yang perlu diperhatikan adalah *temperature melting* (Tm) atau suhu leleh. Tm merupakan suhu dimana 50% untai ganda DNA telah terpisah, Tm yang disarankan yaitu 52°C-58°C [5]. Pada proses PCR Tm berpengaruh pada pemilihan suhu penempelan. Jika suhu melebihi batas yang disarankan, maka akan mengakibatkan amplifikasi yang kurang baik. Sebaliknya jika Tm rendah maka akan mengakibatkan primer menempel di tempat lain [7]. Berdasarkan tabel 1 dan 2, hasil analisis Tm kandidat primer telah memenuhi kriteria primer yang baik.

Karakteristik primer yang baik selanjutnya adalah %GC. %GC merupakan persentase jumlah guanine dan sitosin dalam satu kandidat primer. %GC yang disarankan sebaiknya antara 40% - 60%. Jika %GC rendah, akan menurunkan efisiensi proses PCR karena primer tidak mampu menempel secara efektif pada *template* gen target [3]. Berdasarkan tabel 1 dan 2, hasil analisis %GC kandidat primer telah memenuhi kriteria primer yang baik.

Selanjutnya GC clamp juga merupakan salah satu yang dipertimbangkan pada saat mendesain primer. GC clamp adalah jumlah basa guanin dan sitosin yang terdapat pada 5 basa terakhir (3'). Masing-masing dari kandidat primer memiliki GC clamp 1 hingga 4 basa G/C, jumlah ini masih dapat diterima karena masih memenuhi syarat tidak lebih dari 5 basa. Adanya GC pada ujung 3' berpengaruh untuk terjadinya stabilitas ikatan primer dengan template DNA pada proses PCR. GC yang melebihi 5 basa akan menurunkan spesifisitas primer, karena basa A/T lebih toleran terhadap ketidakcocokan dibanding G/C [3].

Selanjutnya, kandidat primer dianalisis menggunakan program online Netprimer yang dapat diakses dari situs <http://www.premierbiosoft.com/MetPrimer/AnalyzePrimer.jsp> untuk menganalisa ada atau tidak struktur sekunder pada primer serta menentukan pasangan primer yang cocok seperti yang tercantum pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil analisis struktur sekunder kandidat primer menggunakan Netprimer

No	Primer	Repeat	Run	Self dimer (kcal/mol)	Cross dimer (kcal/mol)	Rating
1	F1 :5' TGACGAAGGAGGTAGTAA 3'	-	-	-	-6.16	100.0
	R1 :5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-4.75		90.0
2	F1 :5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-	-7.12	100.0
	R2 :5' GGCCGAAGAATCAGAATA 3'	-	-	-		87.0
3	F1 :5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-	-5.64	100.0
	R3 :5' GCTAATACTGGCAGTGAG 3'	-	-	-6.76		85.0
4	F1: 5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-	-9.04	100.0
	R4 :5' GATGTACACTTCTGGGTG 3'	-	3	-8.26		90.0
5	F1 : 5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-	-7.68	91.0
	R5 :5' CCGAAGAATCAGAATAGG 3'	-	-	-		100.0
6	F2 : 5' CTCGGACTCGTCCTTATC 3'	-	-	-7.85	-9.01	88.0



	R1 : 5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-4.75		91.0
7	F2 : 5' CTCGGACTCGTCCTTATC 3'	-	-	-7.85	-5.88	90.0
	R2 : 5' GGCCGAAGAATCAGAATA 3'	-	-	-		100.0
8	F2 : 5' CTCGGACTCGTCCTTATC 3'	-	-	-7.85	-6.01	90.0
	R3 : 5' GCTAATACTGGCAGTGAG 3'	-	-	-6.76		87.0
9	F2 : 5' CTCGGACTCGTCCTTATC 3'	-	-	-7.85	-5.8	90.0
	R4 : 5' GATGTACACTTCTGGGTG 3'	-	3	-8.26		83.0
10	F2 : 5' CTCGGACTCGTCCTTATC 3'	-	-	-7.85	-5.87	87.0
	R5 : 5' CCGAAGAATCAGAATAGG 3'	-	-	-		100.0
11	F3 : 5' TGAGGATCCTCTACTGGT 3'	-	-	-9.3	-4.53	86.0
	R1 : 5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-4.75		91.0
12	F3 : 5' TGAGGATCCTCTACTGGT 3'	-	-	-9.3	-6.29	86.0
	R2 : 5' GGCCGAAGAATCAGAATA 3'	-	-	-		100.0
13	F3 : 5' TGAGGATCCTCTACTGGT 3'	-	-	-9.3	-7.68	86.0
	R3 : 5' GCTAATACTGGCAGTGAG 3'	-	-	-6.76		87.0
14	F3 : 5' TGAGGATCCTCTACTGGT 3'	-	-	-9.3	-5.95	86.0
	R4 : 5' GATGTACACTTCTGGGTG 3'	-	3	-8.26		83.0
15	F3 : 5' TGAGGATCCTCTACTGGT 3'	-	-	-9.3	-5.95	86.0
	R5 : 5' CCGAAGAATCAGAATAGG 3'	-	-	-		100.0



16	F4 : 5' AGCTCGACTTGATCCTGT 3'	-	-	-5.38	-7.47	90.0
	R1 : 5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-4.75		91.0
17	F4 : 5' AGCTCGACTTGATCCTGT 3'	-	-	-5.38	-6.09	90.0
	R2 : 5' GGCCGAAGAATCAGAATA 3'	-	-	-		100.0
18	F4 : 5' AGCTCGACTTGATCCTGT 3'	-	-	-5.38	-6.66	90.0
	R3 : 5' GCTAATACTGGCAGTGAG 3'	-	-	-6.76		87.0
19	F4 : 5' AGCTCGACTTGATCCTGT 3'	-	-	-5.38	-6.95	90.0
	R4 : 5' GATGTACACTTCTGGGTG 3'	-	3	-8.26		83.0
20	F4 : 5' AGCTCGACTTGATCCTGT 3'	-	-	-5.38	-4.57	90.0
	R5 : 5' CCGAAGAATCAGAATAGG 3'	-	-	-		100.0
21	F5 : 5' TACAGTAGCAGTGTCGGG 3'	-	3	-9.45	-9.6	82.0
	R1 : 5' TTCGATCTGTGAGGAGTA 3'	-	-	-4.75		91.0
22	F5 : 5' TACAGTAGCAGTGTCGGG 3'	-	3	-9.45	-6.19	82.0
	R2 : 5' GGCCGAAGAATCAGAATA 3'	-	-	-		100.0
23	F5 : 5' TACAGTAGCAGTGTCGGG 3'	-	3	-9.45	-8.1	82.0
	R3 : 5' GCTAATACTGGCAGTGAG 3'	-	-	-6.76		87.0
24	F5 : 5' TACAGTAGCAGTGTCGGG 3'	-	3	-9.45	-3.05	82.0
	R4 : 5' GATGTACACTTCTGGGTG 3'	-	3	-8.26		83.0
25	F5 : 5' TACAGTAGCAGTGTCGGG 3'	-	3	-9.45	-7.85	82.0

	R5 : 5' CCGAAGAATCAGAATAGG 3'	-	-	-		100.0

Berdasarkan hasil analisis kandidat primer menggunakan Netprimer yang tercantum pada tabel 3 menunjukkan hasil yang bervariasi pada setiap uji pasangan primer. Hasil tersebut berupa *run*, *repeat*, *hairpin*, *self dimer* dan *cross dimer*. *Run* merupakan adanya urutan satu basa yang berulang, contoh GGG pada primer *reverse 4* pada tabel 3. *Repeat* adalah dua basa yang sama berulang-ulang, berdasarkan hasil analisis tidak ditemukan *repeat* pada setiap primer. Adanya *run* dan *repeat* pada urutan primer (*forward* dan *reverse*) akan menyebabkan penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan dalam proses PCR. Secara umum, *run* dan *repeat* yang tidak lebih dari 4 masih ditoleransi [8].

Selanjutnya, karakteristik primer yang harus dianalisis adalah adanya struktur sekunder primer. Struktur sekunder primer dapat berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas produk PCR, hal ini dikarenakan kemampuan primer menempel akan berkurang pada *template*. Struktur sekunder yang dianalisis berupa *self dimer* dan *cross dimer*, pada program Netprimer juga memberikan rating (penilaian) mengenai kualitas primer, dapat dilihat pada tabel 3. Stabilitas struktur sekunder ditentukan oleh energi bebas (ΔG), energi bebas adalah energi yang diperlukan untuk memecah struktur sekunder [9].

Self dimer terbentuk karena adanya interaksi intermolekuler antara dua molekul primer yang sama (Messe, 2020), contohnya primer *forward* dengan *forward* dan primer *reverse* dengan *reverse*. Pada *self dimer*, parameter yang dilihat adalah energi bebas (ΔG). Nilai ΔG pada *self dimer* harus lebih besar dari -6 kkal/mol (Fakih, 2021). Sedangkan hasil analisis *self dimer* F2 dan F5 pada tabel 3 memiliki nilai ΔG lebih kecil dari -6 kkal/mol, *forward 2* menunjukkan $\Delta G = -7.85$ kkal/mol dan pada *reverse 4* menunjukkan $\Delta G = -8.26$ kkal/mol, sehingga tidak memenuhi karakteristik primer. Menurut [10], untuk memecah struktur sekunder maka diperlukan ΔG yang lebih besar dari -6 kkal/mol. Apabila ΔG kurang dari -6 kkal/mol maka primer akan sulit memecah struktur sekunder yang terbentuk, sehingga primer tidak bisa menempel pada daerah yang diinginkan. Berdasarkan hal tersebut, hasil analisis yang memenuhi ketentuan nilai ΔG *self dimer* terdapat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil final pasangan primer gen mt-CoI

No	Pasangan Primer	Repeat	Run	Self dimer (Kcal/mol)	Cross dimer (kcal/mol)	Rating primer	Posisi primer
1	Forward 1 Reverse 1	- -	- -	- -4.75	-6.16	100.0 90.0	309-326 640-623
2	Forward 1 Reverse 3	- -	- -	- -6.76	-5.64	100.0 87.0	309-326 616-599
3	Forward 4 Reverse 2	- -	- -	-5.38 -	-6.09	90.0 100.0	111-128 726-709
4	Forward 4 Reverse 3	- -	- -	-5.38 -6.76	-6.66	90.0 87.0	111-128 616-599

Analisis selanjutnya berupa *cross dimer* yaitu primer yang berikatan dengan primer pasangannya, *forward* dan *reverse* [2]. Ikatan tersebut dapat diputus jika nilai ΔG lebih besar dari -6 kkal/mol. Sebaliknya jika nilai ΔG kurang dari -6 kkal/mol atau terlalu kecil maka primer akan sulit untuk menempel pada DNA target [10]. Hasil analisis Netprimer *forward 5* dan *reverse 4* pada tabel 3 menunjukkan $\Delta G = -3.05$, dimana telah memenuhi karakteristik perancangan primer. Akan tetapi, pasangan primer ini tidak dapat digunakan untuk proses amplifikasi pada teknik PCR, dikarenakan pada *forward 5 reverse 4* memiliki

nilai ΔG *self dimer* lebih kecil dari -6 kcal/mol sehingga tidak memenuhi karakteristik primer yang baik. Terdapat 4 Pasang primer dengan nilai ΔG *cross dimer* dan ΔG *self dimer* yang memenuhi karakter primer yang baik terdapat pada tabel 4.

Pasangan primer (primer *forward* dan *reverse*) yang dihasilkan, selanjutnya dianalisis spesifisitas serta tingkat kesamaan sekuens asal primer dengan database nukleotida yang ada di GenBank NCBI primer melalui program online BLAST-NCBI yang diakses dari <https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi> Menurut Messe (2020), hasil BLAST akan menampilkan bahwa sepasang primer yang dirancang benar-benar unik atau spesifik terhadap gen *Cytochrome Oxidase I*.

Tabel 5. Hasil BLAST-NCBI pasangan primer gen mt-Col

Primer	Deskripsi	Kesamaan	Kode akses
F 1	<i>Rattus norvegicus mitochondrion, complete genome</i>	100%	NC001665.2
R 1	<i>Rattus norvegicus isolate NM1134 mitochondrion, complete genome</i>	100%	KY754542.1
	<i>Rattus norvegicus breed DLY mitochondrion, complete genome</i>	100%	JF499339.1
	<i>Rattus norvegicus isolate Muridae mitochondrion, complete genome</i>	100%	JF499336.1
	<i>Rattus norvegicus isolate Mus musculus 43-5 mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN651966.1
F1	<i>Rattus norvegicus xionjing mitochondrion, complete genome</i>	100%	KT487428.1
R3	<i>Rattus norvegicus isolate HABUI 01 mitochondrion, complete genome</i>	100%	KU182935.1
	<i>Rattus norvegicus Gerbil mus mitochondrion, complete genome</i>	100%	MK245682.1
	<i>Rattus norvegicus mitochondrion, complete genome</i>	100%	KM498681.1
	<i>Rattus norvegicus mitochondrion, complete genome</i>	100%	KT335604.1
F4	<i>Rattus norvegicus Norway rat mitochondrion, complete genome</i>	100%	KT335600.1
R2	<i>Rattus norvegicus Mongolia mitochondrion, complete genome</i>	100%	JF457098.1
	<i>Meriones unguiculatus mitochondrion, complete genome</i>	100%	KT335553.1
	<i>Rattus norvegicus mitochondrion, complete genome</i>	100%	KM497428.1
	<i>Rattus norvegicus Meriones unguiculatus mitochondrion, complete genome</i>	100%	JX962219.1
F4	<i>Meriones unguiculatus mitochondrion, complete genome</i>	100%	HM031902.1
R3	<i>Rattus norvegicus mitochondrion, complete genome</i>	100%	JO043462.1
	<i>Rattus norvegicus Norway rat mitochondrion, complete genome</i>	100%	KF334528.1
			EF186577.1

Hasil penjarangan menggunakan BLAST-NCBI pada tabel 5, diperoleh nilai kesamaan pasangan primer terhadap template target sebesar 100%, hal tersebut menunjukkan bahwa primer yang dirancang sesuai dengan target yang diinginkan. Primer yang baik adalah primer dengan rangkaian nukleotida yang unik, sehingga tidak menempel pada organisme lain. Berdasarkan hasil yang terdapat dalam tabel 5, pasangan primer ini cukup baik untuk digunakan pada proses PCR.



KESIMPULAN

Pada penelitian ini, telah dilakukan desain primer gen *mt-Cytochrome oxidase I* yang berasal dari Mitokondria DNA *Rattus norvegicus* secara *in silico*. Pasangan primer yang spesifik berhasil didesain secara *in silico*, diperoleh 4 pasang primer yang telah memenuhi kriteria sebagai primer yang baik. Adapun kriteria tersebut adalah panjang primer, suhu leleh (T_m), Persentase GC, *run, repeat, GC clamp* dan struktur sekunder primer. Untuk proses lebih lanjut, sebagai tambahan optimasi di laboratorium perlu untuk dilakukan agar mendapatkan kondisi yang optimal serta memastikan bahwa pasangan primer yang dirancang bisa digunakan untuk mengamplifikasi gen *mt-CoI* dengan baik pada teknik PCR.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] F. Peternakan, U. G. Mada, J. F. No, F. K. Hewan, U. G. Mada, and J. F. No, "IDENTIFIKASI DAGING BABI MENGGUNAKAN METODE PCR-RFLP GEN Cytochrome b DAN PCR PRIMER SPESIFIK GEN AMELOGENIN Pork Identification Using PCR-RFLP of Cytochrome b Gene and," vol. 32, no. 4, pp. 370–377, 2012.
- [2] D. Eling KS, R. Kurniawan, and I. Muhimmah, "Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review," *Semin. Inform. Medis 2014*, pp. 93–102, 2014, [Online]. Available: <http://snimed.fit.uui.ac.id/>.
- [3] P. D. Yustinadewi, P. S. Yustiantara, and I. Narayani, "Mdr-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla," *Metamorf. J. Biol. Sci.*, vol. 5, no. 1, p. 105, 2018, doi: 10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16.
- [4] E. Indriana, "Analisis Sekuen DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I (COI) mtDNA Pada Kukang Indonesia (Nycticebus spp) sebagai Penanda Guna Pengembangan Identifikasi Spesies (Analysis on Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase I (COI) Sequences of Indonesia Slow Lor," pp. 119–128, 2015.
- [5] K. S. Mdr-tb, U. Udayana, and B. Jimbaran, "DESAIN DNA PRIMER SECARA IN SILICO SEBAGAI PENDETEKSI MUTASI GEN gyr A Mycobacterium tuberculosis UNTUK METODE POLYMERASE CHAIN REACTION," vol. 6, pp. 63–69, 2018.
- [6] "abstracts15082022."
- [7] T. M. Fakhri, S. Wijaya, and S. E. Priani, "Desain Primer Gen 12S rRNA dari DNA Mitokondria Babi (Sus scrofa) secara In Silico sebagai Kandidat Primer dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk," *J. Sains Farm. Klin.*, vol. 8, no. 3, p. 316, 2021, doi: 10.25077/jsfk.8.3.316-322.2021.
- [8] I. G. A. A. Septiari, P. S. Yustiantara, and S. C. Yowani, "Analisis Primer untuk Amplifikasi Promoter inhA Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)," *J. Kim.*, vol. 9, no. 1, pp. 117–123, 2015.
- [9] D. Devi Astari, S. Gustiani Dewi, S. Setyaningrum, and B. Lidya, "Perancangan Primer untuk Deteksi Kandungan Gen Cytochrome b Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction dan Aplikasinya pada Berbagai Produk Industri," *Fuller. Journ. Chem*, vol. 6, no. 2, pp. 110–117, 2021, doi: 10.37033/fjc.v6i2.329.
- [10] A. Pratiwi, R. Sari, and P. Apridamayanti, "Optimasi suhu desain primer gen blaZ resistensi pada bakteri Staphylococcus aureus secara in silico," *J. Mhs. Farm. Fak. Kedokt. UNTAN*, vol. 4, no. 1, pp. 3–12, 2019.