



Desain Primer Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (Cox1) Secara in Silico Untuk Mengidentifikasi Cemaran Daging Babi (Sus Scrofa)

Intan Mardini, Aulia Zahrani, Efira Rosa Pane*, Fitrija Wijayanti

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

Abstract. *In Indonesia, the majority of the population is Muslim. Thus, the food products that are distributed must be guaranteed to be halal. There are many cases of adulteration and mixing of pork (Sus scrofa) with beef and other processed products in the community. Therefore, a scientific approach is needed to detect the contamination of Sus scrofa meat in food to protect Muslim consumers. This study aims to design primers from the Cytochrome Oxidase I gene in silico which can be used to identify pork contamination so that the results of the primer design can be used in the PCR amplification process. The sequence of the Cytochrome Oxidase I Sus scrofa gene was downloaded from the NCBI database accessed from the site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> with access code AF304203.1, which has full coding sequences. The primer pairs that were successfully designed according to good primary characteristics were 7 pairs of primers. Based on the results of the specificity test, 7 pairs of primers matched the desired target template.*

Keyword Design Primer, Sus scrofa, Cytochrome oxidase I, in silico

Abstrak. Di Indonesia, mayoritas penduduknya adalah umat muslim. Sehingga, produk pangan yang tersebar harus terjamin kehalalannya. Maraknya kasus pemalsuan dan pencampuran daging babi (Sus scrofa) dengan daging sapi maupun produk olahan di masyarakat sering dilakukan. Oleh sebab itu, diperlukan pendekatan ilmiah untuk mendeteksi adanya kontaminasi daging Sus scrofa terhadap makanan untuk melindungi para konsumen muslim. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer dari gen Cytochrome Oxidase I secara in silico yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi cemaran daging babi, Sehingga, hasil rancangan primer tersebut bisa digunakan dalam proses amplifikasi PCR. Urutan sekuen gen Cytochrome Oxidase I Sus scrofa diunduh dari database NCBI yang diakses dari situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dengan kode akses AF304203.1, yang memiliki urutan pengkodean lengkap (full coding sequences). Pasangan primer yang berhasil dirancang sesuai dengan karakteristik primer yang baik, diperoleh sebanyak 7 pasang primer dengan jumlah ampikon yang bervariasi. Berdasarkan hasil uji spesifisitas, 7 pasang primer sesuai dengan template target yang diinginkan.

Kata kunci: Desain primer, Sus scrofa, Cytochrome oxidase I, in silico

PENDAHULUAN

Kebutuhan sumber protein hewani bagi masyarakat Indonesia seperti daging sapi semakin meningkat, akan tetapi di Indonesia harga daging sapi sangat mahal.

Peningkatan konsumsi daging sapi di masyarakat tidak dapat diimbangi dengan meningkatnya produksi daging sapi, sehingga memicu naiknya harga daging sapi. Keadaan seperti ini menyebabkan maraknya pencampuran serta pemalsuan daging sapi dengan daging lainnya terutama daging babi pada produk olahan [1] Mayoritas penduduk Indonesia adalah umat muslim. Sehingga, produk pangan yang tersebar harus terjamin kehalalannya. Dalam kepercayaan umat muslim, hukum yang telah ditetapkan dalam Al-Qur'an harus dipatuhi yaitu larangan terhadap makan ataupun menggunakan produk apapun yang berasal dari babi (*Sus scrofa*) [2]. Menurut Syukriya & Faridah (2019), *Sus scrofa* jika dikonsumsi dalam bentuk apapun memiliki efek yang berbahaya bagi tubuh. *Sus scrofa* merupakan hewan yang menjadi host bagi parasit atau pembawa penyakit bagi manusia. Hal ini dikarenakan babi menjadi inang dari berbagai macam penyakit yang berbahaya.

Maraknya kasus pemalsuan dan pencampuran daging *Sus scrofa* dengan daging sapi maupun produk olahan di masyarakat sering dilakukan. Hal ini dikarenakan, harga jual daging *Sus scrofa* lebih murah dibandingkan daging sapi, serta kedua daging ini cenderung memiliki kemiripan bentuk fisik dan susah untuk dibedakan oleh orang awam sehingga mudah untuk dipalsukan. Adanya isu tersebut tentu saja meresahkan masyarakat, serta melanggar persyaratan keamanan pangan yang aman, sehat, utuh dan halal [1]. Oleh sebab itu, diperlukan pendekatan ilmiah untuk mendeteksi adanya kontaminasi daging *Sus scrofa* terhadap makanan untuk melindungi para konsumen muslim di Indonesia [4].

Usaha untuk mendeteksi daging yang terkontaminasi oleh daging *Sus scrofa* telah dikembangkan sejak puluhan tahun yang lalu. Deteksi spesies pada daging berbasis asam deoksiribonukleat (DNA) menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) telah berhasil dilakukan dalam mengidentifikasi DNA yang berasal dari daging segar dan produk daging olahan [4]. Banyak teknik analisis molekuler diseluruh dunia yang digunakan saat ini, salah satunya adalah teknik PCR yang paling diterima secara luas [5]. *Polymerase Chain Reaction* (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 primer dengan menghubungkan dNTP (deoksiribonukleotida trifosfat) dalam reaksi ternal [6].

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu pendekatan biologi molekuler yang digunakan untuk otentikasi dan deteksi spesies asal dalam daging dengan cara memperkuat sekuens spesifik spesies dalam genom seperti fragmen mt-DNA gen *Cytochrome oxidase I* (COXI) [4]. Gen *Cytochrome oxidase I* merupakan gen penyandi dalam mt-DNA, sekuens gen ini telah dipilih menjadi salah satu gen yang digunakan dalam *barcoding*. COXI memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam menentukan identitas spesies hampir di semua binatang tingkat tinggi. Banyak kelebihan dari gen COXI untuk mempelajari karakteristik genetik, hal ini karena gen COXI sedikit sekali mengalami *delesi* dan *insersi* pada sekuennya dan terdapat banyak pula bagian yang *conserve* (lestari) sehingga bisa digunakan sebagai DNA *barcoding* di sebagian besar spesies [7].

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 [8]. Primer berfungsi

sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diperbanyak sekaligus menyediakan gugus hidroksi (OH-) pada ujung 3' yang dibutuhkan untuk proses eksistensi DNA [9].

Primer adalah salah satu komponen yang berperan penting dalam proses PCR. Sepasang primer harus mempunyai karakter yang baik agar dapat menempel pada gen target [8], rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan maksimal sehingga menyebabkan produk PCR tidak spesifik dan atau terbentuk primer dimer [6]. Dalam merancang dan menentukan primer terbaik diperlukan beberapa kriteria yang harus dipenuhi [9], 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 [6].

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer dari gen *Cytochrome Oxidase I* yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi cemaran daging babi yang dirancang secara *in silico*. Sehingga, hasil rancangan primer tersebut bisa digunakan dalam proses amplifikasi PCR.

METODOLOGI PENELITIAN

Perancangan Primer

Data sekuens yang telah diunduh dirancang pada program bioedit, dimasukkan data file sekuens *cytochrome oxidase I* ke dalam program bioedit sehingga dapat diketahui posisi panjang basa (bp). Kemudian, tentukan kandidat primer 18-30 panjang basa (bp) pada daerah target yang diinginkan sebanyak 5 pasang kandidat primer.

Selanjutnya, kandidat primer yang didapat diseleksi berdasarkan karakternya untuk memperoleh sepasang primer (*forward* dan *reverse*) yang memiliki karakter primer yang baik. Adapun karakter primer yang baik yaitu, panjang primer, kandungan persen GC, Suhu leleh (T_m), GC clamp dan *Hairpin*. Pengecekan karakter kandidat primer ini dilakukan menggunakan program online *Oligo Analyzer* (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>) [8].

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/AnalyzePrimer.jsp>.

Analisis lain yang dibutuhkan adalah analisis spesifisitas melalui program yang telah disediakan NCBI pada situs <https://BLAST.ncbi.nih.gov/BLAST.cgi>. Analisis ini bertujuan untuk membandingkan sekuen primer yang dirancang dengan sekuen organisme lain yang tersimpan pada website NCBI [10].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain primer adalah tahap awal untuk amplifikasi DNA, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis sampel menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Desain primer yang baik dilakukan secara *in silico*, yaitu dengan basis ilmu bioinformatika. Pada PCR, primer berfungsi untuk berhibridisasi dengan cetakan DNA serta sebagai pembatas daerah yang akan diamplifikasi [11]. Pada penelitian ini, primer yang didesain merupakan primer dari gen target *mt-COX1*

yang dapat diakses dari GenBank NCBI melalui situs www.ncbi.nlm.nih.gov dengan kode akses AF304203.1. Berdasarkan hasil penelusuran data, gen COXI diunduh dengan format FASTA (.txt), secara spesifik penelitian ini hanya menggunakan gen mt-COX1 *Sus scrofa* dengan urutan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

```

1 atgttcgtaa atcgttgact atactcaaca aaccacaaag acatcggcac cctgtaccta
61 ctatttggtg cctgagcagg aatagtgggc actgccttga gcctactaat tcgcgctgaa
121 ctaggtcagc ccggaaccct acttggcgat gatcaaatct ataatgtaat tgttacagct
181 catgcctttg taataatctt ctttatagta ataccatta tgattggggg ttttggtaac
241 tgactcgtac cgctaataat cggagctccc gatatggcct ttccacgta aaacaacata
301 agtttctgac actttccacc atccttccca ttacttctgg catcctcaat agtagaagcc
361 ggagcgggta ctggatgaac tgtatacca cctttagctg gaaacttagc ccatgcaggg
421 gcttcagttg atttaacaat tttctcccta caccttgtag gtgtatcatc aatcctaggg
481 gctattaatt tcattaccac aattattaac ataaaacccc ccgcaatgic tcaataccaa
541 acaccctgtt ttgtctgac agtactaatc acagccgtac tacttctact atccctgcca
601 gttctagcag ctggcattac tatactactg acagaccgca acctgaacac aacctttttt
661 gatccagcag gtggtaggaga ccctatcctt tatcaacact tgttctgatt ttcggacac
721 ccagaagtat acattctcat cttaccagga ttcggaataa tctcccacat tghtaacctac
781 tattcaggtg aaaaagaacc atttggatg ataggcatag tatgagccat aatgtccatt
841 ggattcctag gttttattgt atgggctcac cacatattca ccgtaggaat agacgtagat
901 acccgagcat actttacatc tgmtacaata atcattgcta ttcccactgg agtaaaagta
961 tttagttgat tagctaccct gcacggcggc aatattaat gatcacccgc aatactatga
1021 gctctgggct tcatcttctt attcaccgta ggaggtctaa cgggcattgt actagctaat
1081 tcctccctag acattgtatt acatgataca tattatgtag tcgcacactt ccactatgic
1141 ttatctatag gagcagtgtt cgccattata gggggctttg ttcactgatt cccctattc
1201 tccgggtaca cactcaacca agcatgagca aaaattcact ttgtaatcat attcgtagga
1261 gtaaatataa cattctttcc acaacacttt ctaggactat ccggaatacc tcgacgatac
1321 tccgattatc ctgacgata cacagcatga aatactattt cctcaatagg ctcatcatc
1381 tcaactaacag cagtgatatt aataatctt attatctgag aagcattcgc atcaaaaacga
1441 gaagtatctg cagtagaact gacaagcaca aacctagaat gactacacgg atgtcctcct
1501 ccctatcaca catttgaaga accaacatat atcaacctaa aataa

```

Gambar 1. full coding sequences gen COXI *Sus scrofa*

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

Tabel 1. Kandidat primer *forward* dari gen COXI *Sus scrofa*

No	Sekuen Primer	bp	Tm (°C)	GC (%)	Posisi pada sekuens	GC Clam p	Hair pin
1	Forward 1 : 5' CTTGGGATGAACCGCTAC 3'	18	60.7	55.6	134-151	2	-
2	Forward 2 : 5' GCCCATGACCTACTTGAC 3'	18	58.0	55.6	365-382	1	-
3	Forward 3 : 5' CTTTGAATCGGGTACGTC 3'	18	58.0	50.0	401-408	2	-
4	Forward 4 : 5' GACTGAGCATGGCGATTA 3'	18	60.0	50.0	240-257	1	-

5	Forward 5 : 5' CAAGATCGTCGACCGTAA 3'	18	59.8	50.0	601-618	2	-
---	---	----	------	------	---------	---	---

Tabel 2. Kandidat primer *reverse* dari gen COXI *Sus scrofa*

N o	Sekuen Primer	Bp	Tm (°C)	GC (%)	Posisi pada sekuens	GC Clamp p	Hair pin
1	Reverse 1 : 5' AGGTTGCGGTCTGTCACT 3'	18	61.0	55.6	644-627	1	-
2	Reverse 2 : 5' CATAGTGGAAAGTGTGCGA 3'	18	58.3	50.0	1138-1121	3	-
3	Reverse 3 : 5' TATCGTCGAGGTATTCCG 3'	18	58.5	50.0	1319-1302	3	-
4	Reverse 4 : 5' CGTGCAGGGTAGCTAATC 3'	18	59.5	55.6	985-967	1	-
5	Reverse 5 : 5' GCGTCAGGATAATCGGAG 3'	18	60.8	55.6	13371319	3	-

Secara umum, primer yang memiliki panjang antara 18 hingga 30 panjang basa adalah primer yang ideal. Panjang ini diharapkan baik untuk dapat menempel pada *template* gen target. Primer yang terlalu pendek dapat mengurangi spesifisitas primer, sehingga dapat menempel pada *template* dengan suhu *annealing* yang tidak diharapkan [6]. Sebaliknya, primer yang terlalu panjang akan menunjukkan spesifisitas lebih tinggi serta mengakibatkan terjadi hibridasi dengan primer yang lain, sehingga pembentukan polimerasi DNA akan terhambat [9]. Pada penelitian ini, primer yang dipilih memiliki 18 panjang basa, panjang ini telah memenuhi karakter panjang basa primer.

Karakteristik primer kedua yang perlu diperhatikan adalah Suhu leleh (Tm). *Temperature melting* (Tm) merupakan suhu dimana 50% untaian ganda DNA telah terpisah, Tm yang disarankan adalah 50°C hingga 65°C [9]. Pada proses PCR, Tm berpengaruh pada pemilihan suhu *annealing*. Jika suhu diatas 65°C, maka akan mengakibatkan proses amplifikasi kurang baik karena diakibatkan berkurang suhu *annealing*. Sebaliknya, Tm yang rendah akan mengakibatkan hasil yang tidak spesifik disebabkan oleh primer yang menempel di tempat lain [11]. Dapat dilihat pada tabel 1, hasil analisis Tm kandidat primer telah memenuhi kriteria primer yang baik.

Selanjutnya, %GC merupakan salah satu karakteristik primer yang baik. %GC adalah persentase jumlah guanin dan sitosin dalam 1 kandidat primer, %GC yang disarankan sebaiknya berkisar 40% hingga 60%. Apabila %GC rendah, maka dapat menurunkan efisiensi proses PCR yang diakibatkan primer tidak mampu berkompetensi menempel secara efektif pada *template* gen target [6]. Pada hasil rancangan 5 kandidat primer, seperti pada tabel 1 memiliki %GC yang telah memenuhi karakteristik primer yang baik. Selain itu GC clamp juga dipertimbangkan pada saat meendesain primer, GC clamp adalah jumlah basa guanin dan sitosin yang terdapat pada 5 basa terakhir (3'). Masing-masing dari

kandidat primer yang dirancang memiliki GC clamp 1 hingga 3 basa G/C, jumlah ini masih dapat diterima karena masih memenuhi kriteria tidak lebih dari 5 basa. Adanya GC diujung 3' sangat berpengaruh, untuk membantu untuk terjadinya stabilitas ikatan primer dengan template DNA pada proses PCR. GC yang diatas 5 basa akan menurunkan spesifisitas primer, hal ini dikarenakan basa A/T lebih toleran terhadap mismatch (ketidakcocokan) dibandingkan G/C (Yustinadewi et al., 2018). Selain itu, hal yang tidak diperbolehkan adalah adanya struktur *Hairpin*, yaitu kondisi dimana ujung primer saling berkomplemen. Adanya struktur *hairpin* tidak diperbolehkan sama sekali [9], hasil analisis pada tabel 1 dan 2 tidak terdeteksi adanya struktur *hairpin* pada kandidat primer.

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

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' CTTGGGATGAACCGCTAC 3' R1 :5' AGGTTGCGGTCTGTCAGT 3'	- -	3 -	- -4.55	-11.16	100.0 91.0
2	F1 :5' CTTGGGATGAACCGCTAC 3' R2 :5' CATAGTGGAAGTGTGCGA 3'	- -	3 -	- -	-7.75	100.0 100.0
3	F1 :5' CTTGGGATGAACCGCTAC 3' R3 :5' TATCGTCGAGGTATTCCG 3'	- -	3 -	- -6.76	-5.64	100.0 87.0
4	F1: 5' CTTGGGATGAACCGCTAC 3' R4 :5' CGTGCAGGGTAGCTAATC 3'	- -	3 3	- -9.26	-8.04	100.0 83.0
5	F1 : 5' CTTGGGATGAACCGCTAC 3' R5 :5' GCGTCAGGATAATCGGAG 3'	- -	3 -	- -	-7.68	100.0 100.0
6	F2 : 5' GCCCATGACCTACTTGAC 3' R1 : 5' AGGTTGCGGTCTGTCAGT 3'	- -	3 -	-5.38 -4.55	-6.01	90.0 91.0
7	F2 : 5' GCCCATGACCTACTTGAC 3' R2 : 5' CATAGTGGAAGTGTGCGA 3'	- -	3 -	-5.38 -	-4.88	90.0 100.0
8	F2 : 5' GCCCATGACCTACTTGAC 3' R3 : 5' TATCGTCGAGGTATTCCG 3'	- -	3 -	-5.38 -6.76	-6.01	90.0 87.0
9	F2 : 5' GCCCATGACCTACTTGAC 3' R4 : 5' CGTGCAGGGTAGCTAATC 3'	- -	3 3	-5.38 -9.26	-3.9	90.0 83.0
10	F2 : 5' GCCCATGACCTACTTGAC 3' R5 :5' GCGTCAGGATAATCGGAG 3'	- -	3 -	-5.38 -	-5.87	90.0 100.0
11	F3 : 5' CTTTGAATCGGGTACGTC 3' R1 : 5' AGGTTGCGGTCTGTCAGT 3'	- -	3 -	-7.3 -4.55	-4.53	86.0 91.0
12	F3 : 5' CTTTGAATCGGGTACGTC 3' R2 : 5' CATAGTGGAAGTGTGCGA 3'	- -	3 -	-7.3 -	-6.29	86.0 100.0
13	F3 : 5' CTTTGAATCGGGTACGTC 3'	-	3	-7.3	-7.68	86.0



	R3 : 5' TATCGTCGAGGTATTCCG 3'	-	-	-6.76		87.0
14	F3 5' CTTTGAATCGGGTACGTC 3'	-	3	-7.3	-5.95	86.0
	R4 :5' CGTGCAGGGTAGCTAATC 3':	-	3	-9.26		83.0
15	F3 : 5' CTTTGAATCGGGTACGTC 3'	-	3	-7.3	-5.95	86.0
	R5 : 5' GCGTCAGGATAATCGGAG 3'	-	-	-		100.0
16	F4 : 5' GACTGAGCATGGCGATTA 3'	-	-	-5.38	-7.47	90.0
	R1 : 5' AGGTTGCGGTCTGTCAGT 3'	-	-	-4.55		91.0
17	F4 : 5' GACTGAGCATGGCGATTA 3'	-	-	-5.38	-6.09	90.0
	R2 : 5' CATAGTGGAAAGTGTGCCA 3'	-	-	-		100.0
18	F4 : 5' GACTGAGCATGGCGATTA 3'	-	-	-5.38	-6.66	90.0
	R3 : 5' TATCGTCGAGGTATTCCG 3'	-	-	-6.76		87.0
19	F4 : 5' GACTGAGCATGGCGATTA 3'	-	-	-5.38	-6.95	90.0
	R4 : 5' CGTGCAGGGTAGCTAATC 3'	-	3	-9.26		83.0
20	F4 : 5' GACTGAGCATGGCGATTA 3'	-	-	-5.38	-10.57	90.0
	R5 : 5' GCGTCAGGATAATCGGAG 3'	-	-	-		100.0
21	F5 : 5' CAAGATCGTCGACCGTAA 3'	-	-	-9.45	-9.6	82.0
	R1 : 5' AGGTTGCGGTCTGTCAGT 3'	-	-	-4.55		91.0
22	F5 : 5' CAAGATCGTCGACCGTAA 3'	-	-	-9.45	-6.19	82.0
	R2 : 5' CATAGTGGAAAGTGTGCCA 3'	-	-	-		100.0
23	F5 : 5' CAAGATCGTCGACCGTAA 3'	-	-	-9.45	-8.1	82.0
	R3 : 5' TATCGTCGAGGTATTCCG 3'	-	-	-6.76		87.0
24	F5 : 5' CAAGATCGTCGACCGTAA 3'	-	-	-9.45	-4.05	82.0
	R4 : 5' CGTGCAGGGTAGCTAATC 3'	-	-	-9.26		83.0
25	F5 : 5' CAAGATCGTCGACCGTAA 3'	-	-	-9.45	-7.68	82.0
	R5 : 5' GCGTCAGGATAATCGGAG 3'	-	-	-		100.0

Hasil analisis kandidat primer menggunakan Netprimer menunjukkan hasil yang bervariasi pada setiap uji pasangan primer. Hasil tersebut berupa *run*, *repeat*, *hairpin*, *self dimer* dan *cross dimer* seperti yang tercantum pada tabel 3. *Run* merupakan adanya urutan satu basa yang berulang, contoh GGG pada primer forward 1 pada tabel 3. *Repeat* adalah dua basa yang sama berulang-ulang, berdasarkan hasil analisis tidak terdapat repeat pada setiap primer. Adanya *run* dan *repeat* pada urutan primer (*Forward* dan *reverse*) akan menyebabkan *mispriming* (penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan) pada proses PCR. Secara umum, run dan repeat yang tidak lebih dari 4 masih ditoleransi [12]

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 [13].

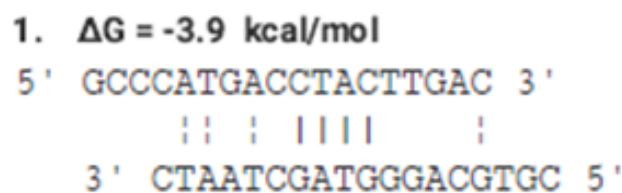
Self dimer terbentuk karena adanya interaksi intermolekuler antara dua molekul primer yang sama [8], contohnya primer *forward* dengan *forward* dan

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 [11]. Sedangkan hasil analisis *self dimer* F5 dan F4 pada tabel 3 memiliki nilai ΔG lebih kecil dari -6 kkal/mol, *forward* 5 menunjukkan $\Delta G = -9.45$ kkal/mol dan pada *reverse* 4 menunjukkan $\Delta G = -9.26$ kkal/mol, sehingga tidak memenuhi karakteristik primer. Menurut [14], 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 COX1

No	Pasangan Primer	Repeat	Ru n	Self dimer (Kcal/mol)	Cross dimer (kcal/mol)	Rating primer	Posisi primer	Panjang produk
1	Forward 1 Reverse 3	- -	3 -	- -6.76	-5.64	100.0 87.0	134-151 1319-1302	1186 bp
2	Forward 2 Reverse 1	- -	3 -	-5.38 -4.55	-6.01	90.0 91.0	365-382 644-627	279 bp
3	Forward 2 Reverse 2	- -	3 -	-5.38 -	-4.88	90.0 100.0	365-382 1138-1121	773 bp
4	Forward 2 Reverse 3	- -	3 -	-5.38 -6.76	-6.01	90.0 87.0	365-382 1319-1302	955 bp
5	Forward 2 Reverse 5	- -	3 -	-5.38 -	-5.87	90.0 100.0	365-382 1337-1319	972 bp
6	Forward 4 Reverse 2	- -	- -	-5.38 -	-6.09	90.0 100.0	240-257 1138-1121	898 bp
7	Forward 4 Reverse 3	- -	- -	-5.38 -6.76	-6.66	90.0 87.0	240-257 1319-1302	1079 bp

Analisis selanjutnya berupa *cross dimer* yaitu primer yang berikatan dengan primer pasangannya, *forward* dan *reverse* [5]. 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 [14]. Hasil analisis Netprimer *forward* 2 dan *reverse* 4 pada tabel 3 menunjukkan $\Delta G = -3.9$, dimana telah memenuhi karakteristik perancangan primer. Akan tetapi, pasangan primer ini tidak dapat digunakan untuk proses amplifikasi pada teknik PCR, dikarenakan pada *reverse* 2 memiliki nilai ΔG *self dimer* lebih kecil dari -6 kkal/mol sehingga tidak memenuhi karakteristik primer yang baik. Terdapat 7 Pasang primer dengan nilai ΔG *cross dimer* dan ΔG *self dimer* yang memenuhi karakter primer yang baik terdapat pada tabel 4. Salah satu contoh pasangan primer yang tidak dapat digunakan untuk proses amplifikasi DNA terdapat pada tabel 3 gambar 2 *forward* 1 dengan *reverse* 4.



Gambar 2. *Cross dimer* yang terjadi pada *forward* 2 dengan *reverse* 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 et al. (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 COX1

Prime r	Deskripsi	Kesamaa n	Kode akses
F1 R3	<i>Sus scrofa domesticus breed Mangalica mitochondrion, complete genome</i>	100%	KJ746666.1
	<i>Sus scrofa isolate DM1122 mitochondrion, complete genome</i>	100%	MT483613.1
	<i>Sus scrofa breed DLY mitochondrion, complete genome</i>	100%	KF569218.1
	<i>Sus scrofa isolate Mangalitsa swallow belly breed 1 mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN601068.1
	<i>Sus scrofa isolate Mangalitsa Blonde breed 43-5 mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN601066.1
F2 R1	<i>Sus scrofa breed Fengjing mitochondrion, complete genome</i>	100%	MH603005.1
	<i>Sus scrofa isolate HEBAO 01 mitochondrion, complete genome</i>	100%	MN258706.1
	<i>Sus scrofa breed Andaman Desi pig mitochondrion, complete genome</i>	100%	MK248682.1
	<i>Sus scrofa breed Nicobari pig mitochondrion, complete genome</i>	100%	MK248681.1
	<i>Sus scrofa mitochondrion, complete genome</i>	100%	MK251046.1
F2 R2	<i>Sus scrofa breed Swallow-belly Mangalica mitochondrion, complete genome</i>	100%	MF183224.1
	<i>Sus scrofa breed Red Mangalica mitochondrion, complete genome</i>	100%	MF183223.1
	<i>Sus scrofa breed Blond Mangalica mitochondrion, complete genome</i>	100%	MF183222.1
	<i>Sus scrofa breed Blond Mangalica mitochondrion, complete genome</i>	100%	KT279760.1
	<i>Sus scrofa haplotype D mitochondrion, complete genome</i>	100%	KJ746666.1
F2 R3	<i>Sus scrofa domesticus breed Mangalica mitochondrion, complete genome</i>	100%	KJ746666.1
	<i>Sus scrofa isolate DM1122, genom lengkap</i>	100%	MT483613.1
	<i>Sus scrofa breed DLY mitochondrion, complete genome</i>	100%	KF569218.1
	<i>Scrofa scrofa breed NS mitochondrion, complete genome</i>	100%	CP071572.1
	<i>Sus scrofa isolate 2 breed Turopolje mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN601072.1



F2	<i>Sus scrofa domesticus breed pietrain mitochondrion, complete genome</i>	100%	KC469587.1
R5	<i>Sus scrofa breed European wild boar haplotype WB5 mitochondrion, complete genome</i>	100%	FJ237002.1
	<i>Sus scrofa domestica mitochondrial DNA, complete genome</i>	100%	AP003428.1
	<i>Sus scrofa domesticus breed pietrain mitochondrion, complete genome</i>	100%	KC469587.1
	<i>Sus scrofa domestica mitochondrial DNA, complete genome</i>	100%	JN601066.1
	<i>Sus scrofa isolate Mangalitsa Blonde breed 43-5 mitochondrion, complete genome</i>	100%	
F4	<i>Sus scrofa breed Large White mitochondrion, complete genome</i>	100%	KC250275.1
R2	<i>Sus scrofa mRNA, clone: CLNT10012D07, expressed in colon</i>	100%	AK400326.1
	<i>Sus scrofa isolate 2 breed Turopolje mitochondrion, complete genome</i>	10%	JN601072.1
	<i>Sus scrofa isolate 2 breed Turopolje mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN601068.1
	<i>Sus scrofa isolate Mangalitsa swallow belly breed 1 mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN601066.1
	<i>Sus scrofa isolate Mangalitsa Blonde breed 43-5 mitochondrion, complete genome</i>	100%	
F4	<i>Sus scrofa isolate Mangalitsa swallow belly breed 1 mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN601068.1
R3	<i>Sus scrofa isolate 2 breed Turopolje mitochondrion, complete genome</i>	100%	JN601072.1
	<i>Sus scrofa isolate 2 breed Turopolje mitochondrion, complete genome</i>	100%	AF304203.1
	<i>Sus scrofa breed Swedish wild boar mitochondrion, partial genome</i>	100%	AF486866.1
	<i>Sus scrofa breed Swedish wild boar mitochondrion, partial genome</i>	100%	FJ236994.1
	<i>Sus scrofa breed Landerace mitochondrion, complete genome</i>		
	<i>Sus scrofa breed Iberian haplotype H5 mitochondrion, complete genome</i>		

Hasil penyejajaran 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 tersebut (tabel 5), pasangan primer ini cukup baik untuk digunakan pada proses PCR.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini, telah dilakukan desain primer gen *Cytochrome oxidase I* (COX1) yang berasal dari Mitokondria DNA *Sus Scrofa* secara *in silico*. Pasangan primer yang spesifik berhasil didesain secara *in silico*, diperoleh 7 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 COX1 dengan baik pada teknik PCR.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Y. Yobelanno Sitompul and S. Artanto, "Desain Primer Berdasarkan Gen Mt-12s Rrna untuk Mendeteksi Cemaran Daging Babi pada Produk Olahan Asal Daging Sapi dengan Metode Multipleks-Pcr Designed Primers Based on Mt-12s rRNA Gene to Detect the Adulteration of Pork in Beef Product Using Multiplex-P," *ACTA Vet. Indones.*, vol. 8, no. 2, pp. 24–30, 2020, [Online]. Available: <http://www.journal.ipb.ac.id/indeks.php/actavetindones>.
- [2] R. Mariyani, Sismindari, "Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction Untuk Deteksi DNA Babi (*Sus scrofa*) Dan Celeng (*Sus barbatus*) Pada Sosis Sapi," *J. Ilm. Indones.*, vol. 6, no. 8, pp. 3296–3940, 2021.
- [3] A. J. Syukriya and H. D. Faridah, "Kajian Ilmiah dan Teknologi Sebab Larangan Suatu Makanan Dalam Syariat Islam," *J. Halal Prod. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 47–48, 2019, [Online]. Available: <https://e-journal.unair.ac.id/JHPR/article/download/13543/7598>.
- [4] A. Ni'Mah, Y. Kartikasari, A. D. Pratama, L. R. Kartikasari, B. S. Hertanto, and M. Cahyadi, "Detection of pork contamination in fresh and cooked beef using genetic marker mitochondrial-DNA cytochrome b by duplex-PCR," *J. Indones. Trop. Anim. Agric.*, vol. 41, no. 1, pp. 7–12, Mar. 2016, doi: 10.14710/jitaa.41.1.7-12.
- [5] 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.uii.ac.id/>.
- [6] 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.
- [7] Wirdateti, E. Indriana, and Handayani, "Analisis Sekuen DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I (COI) mtDNA Pada Kukang Indonesia (*Nycticebus spp*) sebagai Penanda Guna Pengembangan Identifikasi Spesies," *J. Biol. Indones.*, vol. 12, no. 1, pp. 119–128, 2016.
- [8] Y. Messe, I. M. Budiarsa, and ..., "Desain Primer Polymerase Chain Reaction (PCR) secara In Silico untuk Amplifikasi Gen *gyrA* Extensively Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB)," *J. Biol. ...*, vol. 8, no. 2, pp. 616–622, 2020, [Online]. Available: <https://jurnal.fkip.untad.ac.id/index.php/ejipbiol/article/view/1169%0Ahttps://jurnal.fkip.untad.ac.id/index.php/ejipbiol/article/download/1169/1037>.
- [9] L. V. Sasmitha, P. S. Yustiantara, and S. C. Yowani, "DESAIN DNA PRIMER SECARA IN SILICO SEBAGAI PENDETEKSI MUTASI GEN *gyrA* Mycobacterium tuberculosis UNTUK METODE POLYMERASE CHAIN REACTION," *CAKRA Kim*.



- (*Indonesian E-Journal Appl. Chem.*, vol. 6, no. 1, pp. 63–69, 2018, [Online]. Available: www.ncbi.nlm.nih.gov.
- [10] D. Febriyana, T. Febrianti, and Sunarno, “Analisis Spesifisitas dan Sensitivitas Primer,” vol. 2, no. 1, pp. 165–169, 2021.
- [11] T. M. Fakhri, S. Wijaya, and S. E. Priani, “Desain Primer Gen 12S sRNA 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.
- [12] R. K. Praja and R. Rosalina, “Perancangan primer gen lktB pada *Fusobacterium necrophorum* untuk analisis PCR,” *J. Sains dan Teknol. Peternak.*, vol. 2, no. 2, pp. 47–55, 2021, doi: 10.31605/jstp.v2i2.960.
- [13] 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.
- [14] 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.