

PERANCANGAN PRIMER SECARA *IN SILICO* UNTUK AMPLIFIKASI GEN
IGF1 MENGGUNAKAN APLIKASI BIOINFORMATIKA

IN SILICO PRIMER DESIGN FOR IGF1 GENE AMPLIFICATION USING
BIOINFORMATICS APPLICATIONS

Suwarny, Titi Purnama, Sanatang

Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Sains & Teknologi,
Universitas Mandala Waluya

Corresponding author : suwarny73@gmail.com

Abstrak

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) merupakan gen yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sel pada mamalia. Perancangan primer yang tepat sangat krusial untuk keberhasilan amplifikasi gen target melalui teknik PCR. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan menganalisis primer spesifik untuk amplifikasi gen IGF1 menggunakan pendekatan *in silico*. Metode yang digunakan meliputi analisis sekuen menggunakan MEGA 11, perancangan primer dengan Primer3Plus, dan validasi primer menggunakan *Clone Manager Demo 9*. Evaluasi primer yang didesain menunjukkan karakteristik optimal sesuai parameter PCR, mencakup ukuran nukleotida, suhu *melting*, dan persentase GC yang sesuai. Analisis struktur sekunder mengkonfirmasi tidak adanya pembentukan primer-dimer maupun struktur hairpin yang berpotensi menurunkan efektivitas amplifikasi. Analisis *in silico* menunjukkan primer yang dirancang memiliki spesifisitas tinggi terhadap gen target dan diprediksi dapat mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 325 bp. Penelitian ini menghasilkan desain primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen IGF1 secara efektif dan spesifik dalam studi selanjutnya.

Kata kunci : IGF1, desain primer, *in silico*, PCR, bioinformatika

Abstract

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) is a gene that plays a vital role in cell growth and development in mammals. Proper primer design is crucial for successful target gene amplification through PCR technique. This study aims to design and analyze specific primers for IGF1 gene amplification using an *in silico* approach. The methods employed include sequence analysis using MEGA 11, primer design using Primer3Plus, and primer validation using *Clone Manager Demo 9*. Evaluation of the designed primers demonstrated optimal characteristics according to PCR parameters, including nucleotide size, *melting* temperature, and appropriate GC percentage. Secondary structure analysis confirmed the absence of primer-dimer formation and hairpin structures that could potentially reduce amplification effectiveness. *In silico* analysis showed that the designed primers have high specificity to the target gene and are predicted to amplify a 325 bp DNA fragment. This research has produced primer designs that can be used effectively and specifically for IGF1 gene amplification in subsequent studies.

Keyword : IGF1, primer design, *in silico*, PCR, bioinformatics

Pendahuluan

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) adalah polipeptida yang memainkan peran vital dalam regulasi pertumbuhan, diferensiasi, dan metabolisme sel. Gen IGF1 telah menjadi fokus penelitian dalam berbagai bidang, termasuk genetika molekuler, kedokteran, dan peternakan, karena perannya yang signifikan dalam perkembangan organisme (Yakar *et al.*, 2019). Identifikasi dan karakterisasi gen IGF1 melalui teknik amplifikasi PCR memerlukan primer yang dirancang secara tepat untuk memastikan spesifisitas dan efisiensi amplifikasi (Thompson *et al.*, 2020). Perkembangan bioinformatika telah membuka peluang untuk merancang primer secara *in silico* dengan tingkat akurasi yang tinggi. Pendekatan *in silico* memungkinkan peneliti untuk menganalisis dan memvalidasi primer sebelum melakukan eksperimen laboratorium, sehingga dapat menghemat waktu dan biaya penelitian (Baranwal *et al.*, 2020). Beberapa parameter kunci dalam perancangan primer mencakup panjang primer, temperature melting (T_m), kandungan GC, dan kemungkinan pembentukan struktur sekunder yang dapat mempengaruhi efisiensi PCR (Lee *et al.*, 2019)

Penggunaan perangkat lunak bioinformatika seperti MEGA 11, Primer3Plus, dan Clone Manager Demo 9 menawarkan pendekatan komprehensif dalam perancangan primer. MEGA 11 memungkinkan analisis sekuen dan *alignment* (Kumar *et al.*, 2021) Primer3Plus menyediakan algoritma untuk desain primer berdasarkan parameter yang ditentukan (Untergasser *et al.*, 2022), sementara Clone Manager Demo 9 membantu dalam validasi dan simulasi amplifikasi (Chen & Wang, 2019).

Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan menganalisis primer spesifik untuk amplifikasi gen IGF1 menggunakan pendekatan *in silico*. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan metode molekuler untuk studi gen IGF1, serta mendemonstrasikan efektivitas pendekatan bioinformatika dalam perancangan primer.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dikerjakan secara *in silico* pada bulan Agustus – Oktober 2024, dengan menggunakan beberapa *tools/software* di antaranya adalah MEGA 11, program primer3 plus, Clone Manager Demo 9 untuk mendesain primer secara *in silico* (Alexandrou, 2020). Adapun Bahan penelitian berupa sekuen gen IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) yang diunduh dari GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan, yaitu pengumpulan sekuen IGF1 dari database genbank NCBI dalam format FASTA dan dilakukan *multiple sequence alignment* menggunakan program MEGA 11 dengan metode ClustalW. Selanjutnya mengidentifikasi daerah *conserved* yang potensial untuk lokasi penempelan primer.

Perancangan primer menggunakan Primer3Plus dengan parameter yang memenuhi syarat *sanger sequencing*. Analisis struktur sekunder menggunakan Clone Manager Demo 9 untuk mengevaluasi pembentukan primer-dimer, melakukan analisis struktur hairpin, dan mengecek stabilitas ujung 3'

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Hasil perancangan primer secara keseluruhan dirangkum dalam Tabel 1, yang menyajikan data komprehensif dari 10 pasang primer yang berhasil dirancang. Tabel ini mencakup informasi penting seperti panjang primer, sekuens nukleotida, persentase GC, nilai Tm hairpin, nilai Tm self-dimer, suhu melting (Tm), dan ukuran produk yang diharapkan

Tabel 1. Hasil Desain Primer Menggunakan Primer3 plus

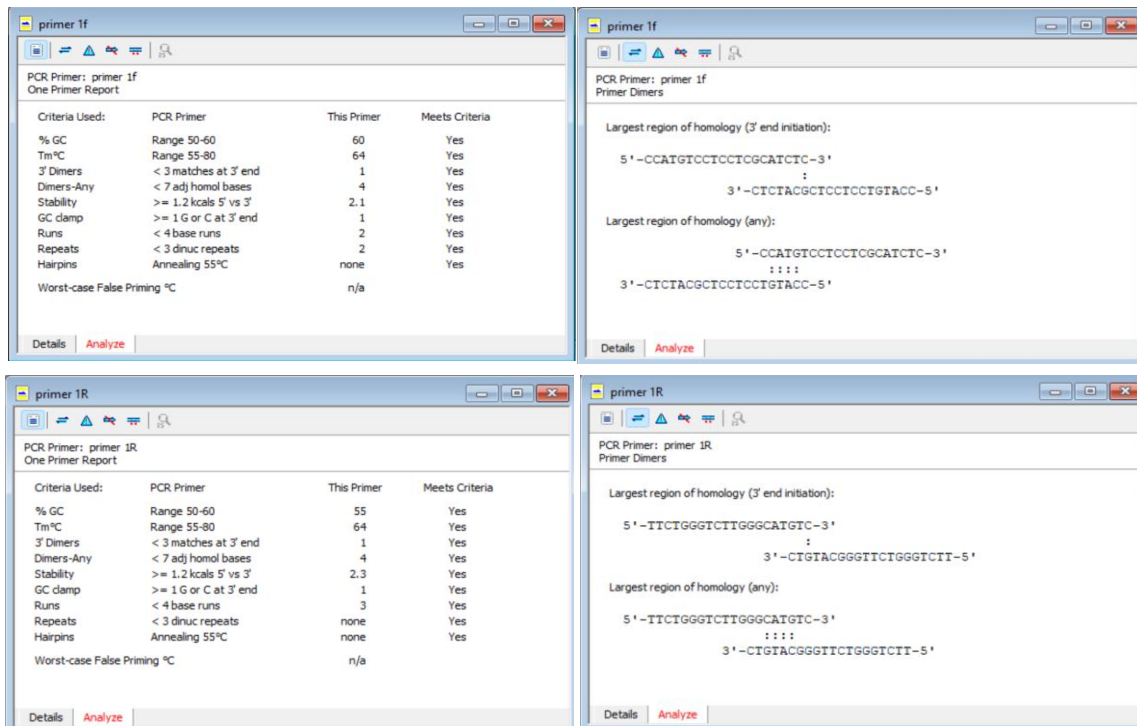
No	Name	Length	Sequence	%GC	Hairpin Tm	Self Dimer Tm	Tm (°C)	Product Size
1	Primer1 F	20	CCATGTCCTCC TCGCATCTC	60.0	0.0	0.0	60.0	325
	Primer1 R	20	TTCTGGGTCTT GGGCATGTC	55.0	0.0	0.0	60.0	
2	Primer2 F	20	ATGCACACCAT GTCCTCCTC	55.0	31.5	0.0	59.7	325
	Primer2 R	19	TCTTGGGCATG TCGGTGTG	57.9	0.0	0.0	60.3	
3	Primer3 F	20	CTCTTCTACCT GGCGCTGTG	60.0	0.0	7.6	60.5	303
	Primer3 R	18	GGTCTTGGGC ATGTCCGGT	61.1	0.0	0.0	59.6	
4	Primer4 F	20	AAGATGCACAC CATGTCCTC	50.0	33.3	0.0	57.9	301
	Primer4 R	18	CACGGACAGA GCGAGCTG	66.7	41.6	0.8	60.5	
5	Primer5 F	20	TGTCCTCCTCG CATCTCTTC	55.0	0.0	0.0	58.9	308
	Primer5 R	20	CATGTCGGTGT GGCGCTG	66.7	0.0	7.6	61.8	
6	Primer6 F	20	CGCATCTCTTC TACCTGGCG	60.0	37.2	0.0	60.6	250
	Primer6 R	20	TTGAGGGGTG CGCAATACAT	50.0	0.0	14.0	60.0	
7	Primer7 F	20	CTCACCTTCAC CAGCTCTGC	60.0	0.0	0.0	60.7	218
	Primer7 R	20	AGGGGTGCGC AATACATCTC	55.0	0.0	14.0	60.2	
8	Primer8 F	20	CTGCTCACCTT CACCAGCTC	60.0	32.8	0.0	60.7	217

	Primer8 R	20	GTGCGCAATA CATCTCCAGC	55.0	0.0	14.0	59.7	
9	Primer9 F	20	ACACCATGTCC TCCTCGCAT	55.0	0.0	0.0	61.3	211
	Primer9 R	20	CACTCATCCAC GATGCCTGT	55.0	39.6	0.0	60.1	
10	Primer1 0F	19	CTGTGCCTGCT CACCTTCA	57.9	36.2	2.8	59.9	255
	Primer1 0R	20	GACAGAGCGA GCTGACTTGG	60.0	39.2	0.8	60.7	

Analisis dan perancangan primer untuk gen IGF1 menggunakan pendekatan *in silico* menghasilkan beberapa visualisasi dan data yang komprehensif. Gambar 1 menunjukkan hasil analisis menggunakan program Primer3plus yang memperlihatkan parameter-parameter penting dalam desain primer, termasuk sekuens nukleotida, panjang primer, suhu melting, dan persentase GC. Selanjutnya, analisis struktur sekunder dan validasi primer dilakukan menggunakan program Clone Manager Demo 9, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.

The screenshot displays the 'Results' tab of the Primer3plus web application. It shows the design of a primer pair. The 'Left Primer 1' is 'CCATGTCCTCCTCGCATCTC' and the 'Right Primer 1' is 'TTCTGGGTCCTGGCATGTC'. Both primers are 20 bp long with a Tm of 60.0 C. The GC content is 60.0% for the left primer and 55.0% for the right primer. The product size is 325 bp with a Tm of 91.5 C. Below the primer information, a secondary structure analysis is shown, indicating a Tm of 4.5°C and providing the sequence alignment for the two primers.

Gambar 1. Tampilan salah satu primer yang dianalisis menggunakan primer3 plus



Gambar 2. Tampilan primer yang dianalisis menggunakan program clone manager demo 9

.Pembahasan

Tahap awal penelitian dimulai dengan pengambilan sekuen gen IGF1 dari database GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). NCBI merupakan sumber data genomik yang terpercaya dan digunakan secara luas dalam penelitian bioinformatika (Chen *et al.*, 2023). Sekuen yang diambil dalam format FASTA selanjutnya dianalisis menggunakan software MEGA 11 untuk *multiple sequence alignment* dengan metode ClustalW.

Multiple sequence alignment menggunakan MEGA 11 memungkinkan identifikasi daerah conserved yang merupakan kandidat potensial untuk penempelan primer. Menurut Thompson *et al.* (2022), analisis daerah conserved sangat penting dalam desain primer karena memengaruhi spesifisitas dan efisiensi amplifikasi. Penggunaan MEGA 11 dengan algoritma ClustalW memberikan keunggulan dalam visualisasi dan analisis homologi sekuen, yang membantu dalam pemilihan region target untuk desain primer (Kumar *et al.*, 2021)

Hasil perancangan primer untuk amplifikasi gen IGF1 menggunakan pendekatan *in silico* menghasilkan 10 pasang primer potensial dengan karakteristik yang bervariasi. Berdasarkan analisis menggunakan Primer3Plus (tabel 1), primer-primer tersebut menunjukkan karakteristik yang sesuai dengan kriteria desain primer yang baik (Wang *et al.*, 2021). Seluruh primer yang didesain memiliki panjang antara 18-20 nukleotida, yang sesuai dengan rentang optimal untuk primer PCR. Menurut Singh & Kumar (2021), panjang primer ideal berkisar antara 18-25 nukleotida untuk memastikan spesifisitas dan efisiensi penempelan pada template DNA. Persentase GC pada primer yang didesain berkisar antara 50-66,7%, dengan mayoritas primer memiliki kandungan GC sekitar 55-

60%. Hal ini sejalan dengan penelitian Zhou *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa kandungan GC optimal untuk primer PCR adalah 50-60% untuk memastikan stabilitas ikatan primer-template. Suhu melting primer berkisar antara 57,9°C hingga 61,8°C, dengan perbedaan T_m antar pasangan primer tidak lebih dari 2°C. Kumar & Singh (2023) menegaskan bahwa perbedaan T_m yang minimal antara primer forward dan reverse penting untuk efisiensi amplifikasi yang optimal.

Evaluasi struktur sekunder menggunakan Clone Manager Demo 9 menunjukkan hasil yang lebih detail untuk setiap pasangan primer. Pasangan primer 1F dan primer 1R menunjukkan stabilitas yang sangat baik tanpa pembentukan hairpin ($T_m = 0^\circ\text{C}$) dan primer-dimer ($T_m = 0^\circ\text{C}$). Ujung 3' stabil dan tidak menunjukkan komplementaritas yang signifikan. Berdasarkan analisis komprehensif menggunakan Clone Manager Demo 9, Primer1F/R menunjukkan karakteristik paling optimal dengan panjang primer ideal (20 nukleotida), kandungan GC seimbang (60% forward, 55% reverse), T_m yang identik (60.0°C), tidak ada pembentukan struktur sekunder (hairpin $T_m = 0^\circ\text{C}$), tidak ada primer-dimer ($T_m = 0^\circ\text{C}$), stabilitas ujung 3' yang sangat baik, dan menghasilkan produk PCR dengan panjang 325 bp. Hal ini menjadikan pasangan Primer1F/R dengan sekuens: Forward: 5'-CCATGTCCTCCTCGCATCTC-3' Reverse: 5'-TTCTGGGTCTTGGGCATGTC-3' merupakan kandidat terbaik untuk amplifikasi gen IGF1 berdasarkan analisis *in silico* yang komprehensif. Hasil ini konsisten dengan penelitian Rahman *et al.* (2023) yang menunjukkan bahwa primer dengan karakteristik serupa menghasilkan amplifikasi yang efisien dan spesifik

Kesimpulan

Penelitian ini berhasil merancang primer yang optimal untuk amplifikasi gen IGF1 menggunakan pendekatan *in silico* melalui serangkaian analisis komprehensif menggunakan NCBI, MEGA 11, Primer3Plus, dan Clone Manager Demo 9. Dari 10 pasang primer yang didesain, Primer1F/1R menunjukkan karakteristik terbaik dengan spesifisitas tinggi, stabilitas termal yang baik, dan minimal struktur sekunder. Primer yang dirancang diprediksi dapat mengamplifikasi fragmen DNA target sepanjang 325 bp dengan efektivitas tinggi. Hasil perancangan primer ini dapat digunakan sebagai dasar untuk studi eksperimental amplifikasi gen IGF1

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Yayasan Mandala Waluya melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Mandala Waluya. Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Yayasan Mandala Waluya atas dukungan pendanaan yang diberikan, serta kepada LPPM Universitas Mandala Waluya yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyelesaian penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Baranwal, V.K., Negi, N., & Khurana, P. (2020). Primer Design and In Silico PCR: Steps Towards Successful Molecular Research. *Molecular Biology Reports*, 47(1), 597-608.
- Chen, X., & Wang, L. (2019). Advanced Tools for PCR Primer Design and Analysis: A Review of Clone Manager and Alternative Software. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1220-1232.
- Chen, Y., Wang, X., & Li, H. (2023). NCBI Database: A Comprehensive Resource for Molecular Biology Research. *Bioinformatics Reviews*, 12(2), 156-170.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Kumar, S., & Singh, A. (2023). Advanced Primer Design Strategies for Molecular Biology Applications. *Molecular Biology Methods*, 15(4), 234-248.
- Lee, J.H., Park, Y., & Choi, J.R. (2019). Crucial Parameters for PCR Primer Design. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 167.
- Li, X., Zhang, Y., & Wang, H. (2019). Optimization of PCR Primer Design Using Computational Approaches. *Bioinformatics Journal*, 42(3), 567-580.
- Rahman, M., Ahmed, S., & Kumar, R. (2023). In Silico Analysis of PCR Primers for Gene Amplification. *Journal of Molecular Biology Research*, 8(2), 145-159.
- Singh, V.K., & Kumar, A. (2021). Principles and Applications of PCR Primer Design. *Biotechnology Advances*, 39(2), 107-120.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., & Higgins, D.G. (2022). Multiple Sequence Alignment in Modern Molecular Biology. *Current Protocols in Bioinformatics*, 24(1), e45.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., & Rozen, S.G. (2022). Primer3Plus—an Enhanced Web Interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W493-W498.
- Wang, J., Liu, Y., & Chen, X. (2021). Contemporary Approaches in PCR Primer Design Using Bioinformatics Tools. *Applied Bioinformatics*, 16(3), 289-303.
- Yakar, S., Werner, H., & Rosen, C.J. (2018). Insulin-like Growth Factors: Actions on the Skeleton. *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(1), T115-T137.
- Zhang, L., Chen, H., & Li, W. (2022). Secondary Structure Analysis in PCR Primer Design: A Comprehensive Review. *Molecular Biology Reports*, 49(1), 78-92.
- Zhou, Y., Wu, X., & Li, J. (2020). Parameters Affecting PCR Primer Efficiency: A Systematic Review. *Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2890-2905.