

**DESAIN PRIMER GEN EDNRB EKSON 1 UNTUK ANALISIS MUTASI GEN
PADA HIRSCHSPRUNG'S DISEASE**

**EDNRB EXON 1 GENE PRIMER DESIGN FOR GENE MUTATION ANALYSIS
IN HIRSCHSPRUNG'S DISEASE**

Nur Anisa Wahyuni, Yuni Ahda

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas
Negeri Padang, Sumatera Barat

Corresponding author : nuranisawhyn2003@email.com

Abstrak

Gen reseptor endotelin tipe B (*EDNRB*) terletak pada kromosom 13, terdiri dari 7 ekson dan 6 intron. Protein *EDNRB* yang dihasilkan dari gen ini termasuk dalam keluarga reseptor berpasangan dengan protein-G. Mutasi pada gen *EDNRB* berperan dalam beberapa kasus penyebab *Hirschsprung*, meskipun frekuensinya rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer dan di uji spesifisitas dengan menggunakan primer *BLAST* untuk menentukan primer spesifik menempel pada gen *EDNRB*. Primer didesain menggunakan *Geneious Prime*, yang kemudian dianalisis secara *in silico* berdasarkan kriteria primer yang baik. Hasil dari penelitian ini diperoleh primer yang dibuat menggunakan *Geneious Prime* menghasilkan primer terbaik yaitu primer *forward* 5'-GAGTTCGGAG CTTTGCCT-3' dan *reverse* 5'-AGCCCACCATGATTTTCAGC-3' dan hasil dari uji spesifisitas menunjukkan bahwa primer secara spesifik menempel pada *chromosome* 13 yang merupakan Lokasi gen *EDNRB* (13q22) dengan Panjang produk 879 bp.

Kata kunci : Gen *EDNRB*, Desain Primer, *Hirschsprung Disease*

Abstract

The endothelin receptor type B (*EDNRB*) gene is located on chromosome 13, consisting of 7 exons and 6 introns. The *EDNRB* protein produced from this gene belongs to the family of G-protein coupled receptors. Mutations in the *EDNRB* gene play a role in some cases of *Hirschsprung's* cause, although the frequency is low. This study aims to design primers and test specificity using *BLAST* primers to determine the specific primer attached to the *EDNRB* gene. Primers were designed using *Geneious Prime*, which were then analyzed *in silico* based on good primer criteria. The results of this research showed that primers made using *Geneious Prime* produced the best primers, namely forward primer 5'-GAGTTCGGAGCTTTGCCT-3' and reverse 5'-AGCCCACCA TGATTTCA GC-3' and the results of the specificity test showed that the primer specifically attached to *chromosome* 13 which is the location of the *EDNRB* gene (13q22) with a product length of 879 bp.

Kata kunci : *EDNRB* Gene, Primer Design, *Hirschsprung's Disease*

Pendahuluan

Penyakit *Hirschsprung* (HSCR) adalah gangguan perkembangan sistem saraf enterik (ENS), yang disebabkan oleh migrasi, proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel punca saraf (NCC) yang rusak, yang menyebabkan tidak adanya ganglia di dinding usus (aganglionosis coli). *Neural crest* (crista neuralis) (NC) adalah struktur embrionik yang sangat penting, yang memunculkan berbagai macam spektrum populasi sel, termasuk ENS. Karena sebagian besar faktor etiopatogenetik yang menonjol dalam pengembangan HSCR adalah kelainan NC, kondisi ini termasuk dalam kategori neurokristopati. Tidak adanya ganglia ENS yang dihasilkan sepenuhnya di bagian usus yang terkena menyebabkan obstruksi fungsional, yang secara klinis bermanifestasi dengan cepat setelah kelahiran. Manifestasi yang selalu muncul adalah tidak terjadinya gerakan peristaltis usus sehingga tidak terjadi aliran feses menuju rektum (Torroglosa *et al.*, 2019). Penyakit HSCR adalah kelainan gastrointestinal yang dipengaruhi oleh gen. Penelitian di berbagai negara menunjukkan kelainan ini disebabkan oleh mutasi dari gen-gen yang terlibat dalam perkembangan saraf di usus, seperti gen *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *PHOX2B*, *SOX10*, *PAX3*, *SHH*, *IHH*, *GLI*, dan *ZEB2* (*SIP1*, *ZBFX1B*). Mutasi dapat berupa mutasi *nonsense*, mutasi *missense*, delesi kecil, dan substitusi. Dari banyak gen yang diteliti, gen utama yang berkontribusi terhadap patogenesis HSCR adalah *RET* (Wang *et al.* 2020; Wu *et al.* 2021; Kyrklund *et al.* 2020; Fadista *et al.* 2018; Emison *et al.* 2010; Quedas *et al.* 2012). Proto-onkogen *RET* telah diidentifikasi pada 50% kasus familial dan 15-35% kasus sporadic (Fadista *et al.* 2018; Emison *et al.* 2010; Quedas *et al.* 2012).

Prevalensi kejadian HSCR adalah 1:5000 kelahiran hidup di populasi umum dunia. Namun dari beberapa penelitian diketahui prevalensi dipengaruhi oleh daerah dan ras yang berbeda-beda (Klein & Varga, 2020). Di Eropa, kejadiannya adalah 1,09 kasus per 10.000 kelahiran hidup dan populasi Asia memiliki angka kejadian 2,8 per 10.000 kelahiran hidup, sementara prevalensi di Indonesia 3,1 kasus per 10.000 kelahiran hidup. Gen reseptor endotelin tipe B (*EDNRB*) terletak pada kromosom 13 pada bagian q22 (*GenBank* ID 1910), dengan panjang sekitar 24 Kb, terdiri dari 7 ekson dan 6 intron. Protein *EDNRB* yang dihasilkan dari gen ini termasuk dalam keluarga reseptor berpasangan dengan protein-G yang berfungsi untuk mengikat ligan endotelin (*ET*) untuk mengirimkan sinyal ekstraseluler. Selama proses perkembangan embrio, *EDNRB* berperan penting dalam migrasi dan diferensiasi sel *neural crest* menjadi sel ganglion, yang berhubungan dengan penyakit megacolon (Wei *et al.* 2020).

Penelitian Widowati *et al.* (2016), reseptor endotelin tipe B (*EDNRB*) adalah gen kedua yang paling banyak mengalami mutasi setelah *RET* dalam HSCR. Mutasi *EDNRB* heterozigot dapat menjadi predisposisi HSCR yang terisolasi dengan penetrasi yang tidak sempurna, sedangkan mutasi *EDNRB* homozigot dapat menghasilkan fenotipe yang lebih kompleks, yang terdiri atas HSCR dan gejala dari *Shah Waardenburg type 4* (WS4). Hasil analisis pada pasien HSCR, ditemukan perubahan asam amino triptofan menjadi sistein pada posisi asam amino ke 276. Mutasi yang ditemukan bersifat sporadis karena tidak ditemukan pada orang tua pasien (Tam and Garcia-Barcelo 2009; Karim *et al.* 2021). Amiel *et al.*, (1996), ditemukan bahwa terdapat variasi heterozigot pada ekson 1. Jenis mutasi yang ditemukan adalah mutasi *missense* transversi G ke A pada nukleotida dan mutasi (GGT→A*GT). Setiap kasus, mutasi ditemukan diwarisi dari pembawa tanpa gejala. Berdasarkan permasalahan di atas maka dilakukan penelitian desain primer untuk gen *EDNRB* pada ekson 1 dan mengungkapkan adanya mutasi pada daerah tersebut. Primer yang didesain di uji secara *in silico* menggunakan primer *BLAST*.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2024 – Februari 2025 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Prosedur Penelitian

1. Desain Primer gen *EDNRB*

Primer didesain menggunakan software *Geneious Prime*. Sekuen gen *EDNRB* (Accession number: NG_011630.3) diunduh pada situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format *GenBank*. Selanjutnya primer yang sesuai dengan kriteria primer yang baik diuji spesifisitas secara *in silico* menggunakan *Primer BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) yang terdapat pada situs NCBI. Laman NCBI juga menyediakan fasilitas *Primer-Basic Local Alignment Search Tool* (Primer-BLAST) yang dapat digunakan untuk merancang primer yang spesifik secara *in-silico*. *Primer-BLAST* berfungsi untuk mengetahui desain primer *online* dapat berikatan dengan gen target yang berada pada *GenBank* (Bedwell & Goldberg, 2020).

2. Analisis Data

Data yang diperoleh pada hasil penelitian dibahas secara deskriptif kualitatif. Data yang akan dianalisis adalah data FASTA dari gen *EDNRB*, karakteristik sekuens primer hasil desain, dan hasil uji spesifisitas primer menggunakan primer *BLAST*.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Gen *EDNRB*

Berdasarkan hasil penelusuran pangkalan data NCBI, hanya diperoleh satu sekuens gen *EDNRB*. Format FASTA gen *EDNRB* ditunjukkan pada (Gambar 1). Gen *EDNRB* memiliki panjang sekuens 879 bp (base pair atau pasangan basa).

Homo sapiens endothelin receptor type B (*EDNRB*), RefSeqGene on chromosome 13

NCBI Reference Sequence: NG_011630.3

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

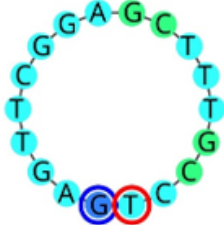
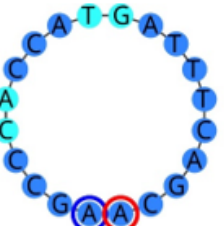
```
>NG_011630.3 Homo sapiens endothelin receptor type B (EDNRB), RefSeqGene on chromosome 13
TGATCCCTTTACTCTTGACAATCAAGGACTCTAATCTACAGGCTTTTACTTCTAACTCATTCTAAAAATA
CATTTCAACTCACAGTTCACAAATTCAGCCTCTTGAACCACTTTTCTGTACTTAAACCTCATTACCTAT
CTCATTTTTCATGACTTTCTTTGCTATAAAGGTCATGGATTAATTACCATATTTCTTCCCTTATAAAT
CAGCAGGTATTAATTTCTTAATGAATCATCAACTATTTATCAAGAGCCTATCATGTACCAGGCATTGTT
TTAGGTGCTGGGCTACAGATATTAACAAGACAACATAAAGAAGTTGCACTAATAATACACAACAAT
ACCAAAAAGTAATGTAATCAACAATGACCTATATGAAAAGGAAATTAAGACAATCCCATTTGCAATA
TCATCAAACATAGTAAAATCTTTGGAATACATCTAACCATGGAGGTGAAAGATTGTACACTGAAAAC
ATAAAACATTGATTAAAGAAGTTAAAGTAGGCACAAATAATAGAAAGACATCCTGTGTTTCATAGATTGG
ATGAATCAATATTGTTAAAACATCCATATGACTCAAATAATCTATAGATTCAATGAAACCCCTGTCAAA
```

Gambar 1. Format FASTA gen *EDNRB*

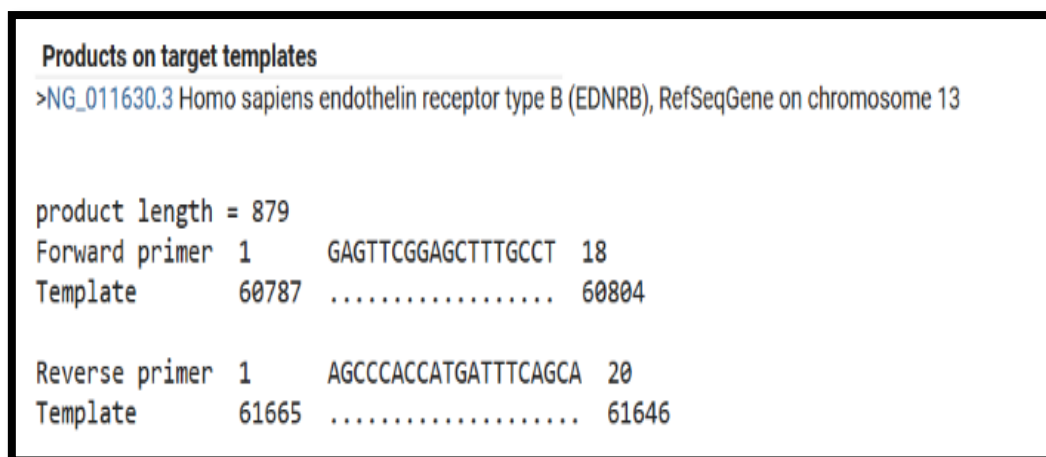
Desain primer menggunakan *Geneious Prime*

Desain primer yang dilakukan terhadap sekuens gen *EDNRB* dengan (*Accession number*: NG_011630.3) mendapatkan primer *Forward* 5'-GAGTTCGGAGCTTTGCCT-3' dan primer *Reverse* 5'-AGCCC CCATGATT CAGC-3'. Primer yang dipilih merupakan primer yang memenuhi kriteria terbaik (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik Hasil Desain Primer Ekson 1

Sequence (5'→3')	Karakteristik					
	%GC	TM (°C)	Hair pin	Self dimer	Panjang basa (nt)	Produk PCR (bp)
Kandidat primer	55.6	57.3	None	None	18	879 bp
Forward						
5'-GAGTTCGGAGCTTTGCCT-3'						
DNA fold						
						
Revers						
5'-AGCCCACCATGATTTCAGC-3'						
DNA fold						
						

Selanjutnya kandidat primer yang dipilih dilakukan uji spesifisitas secara *in silico* menggunakan *Primer-BLAST* berdasarkan database *Refseq representative genomes*. Hasil uji spesifisitas menunjukkan bahwa primer secara spesifik menempel pada *chromosome* 13 (Gambar 2) yang merupakan lokasi Gen *EDNRB* (13q22) dengan panjang produk 879 bp.



Gambar 2. Hasil *BLAST Primer*

Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan desain primer Gen *EDNRB* (Accession: NG_011630.3) pada ekson 1 dengan menggunakan program *Geneious Prime*. Hasil penelitian ini diperoleh pasangan primer *forward* 5'-GAGT TCGGAGCTT TGCCT-3' dan *reverse* 5'-AGCCACCAT GATTTCAGC-3'. Pasangan primer yang dipilih merupakan parameter primer yang ideal terdiri dari panjang primer, % GC (*Guanine-Cytosine*), *Tm* (*melting temperature*), *primer interactions* (*dimers* dan *hairpins*), *primer stability*, *repeats*, *runs*, dan *false priming* (Maitriani *et.al*, 2015). Primer yang baik memiliki panjang antara 18-30 nukleotida. Primer dengan panjang yang kurang dari 18 nukleotida akan membuat penempelan primer menjadi tidak spesifik (Pranata & Ahda, 2021), dan pasangan primer yang telah dipilih memiliki panjang basa 18-20 bp.

Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diperbanyak sekaligus menyediakan gugus hidroksil (OH) pada ujung 3' yang dibutuhkan untuk proses ekstensi DNA. Sepasang primer harus mempunyai karakter yang baik agar dapat menempel pada gen target. Rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan maksimal sehingga menyebabkan produk PCR tidak spesifik (Farikh *et al.* 2023). Nilai *Tm* yang optimal menurut Borah (2011) untuk sebuah primer, yaitu dengan rentang *Tm* 52-58°C. Pasangan suatu primer yang baik memiliki selisih nilai *Tm* yang tidak lebih dari 5°. Perbedaan nilai *Tm* antar dua primer yang melebihi 5°C akan menyebabkan penurunan proses amplifikasi, atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi (Wardi *et al.* 2021).

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer untuk meminimalisir adanya struktur dimer pada primer adalah jumlah ikatan G-C pada primer dan letak ikatan G-C tersebut. Primer dengan jumlah ikatan G-C yang banyak akan mendorong primer untuk membuat dimer daripada berikatan dengan gen target dan juga dapat mengurangi konsentrasi DNA. Letak ikatan G-C juga perlu diperhatikan karena ikatan G-C yang terletak dekat dengan ujung 3' memiliki kecenderungan primer untuk membuat dimer dan juga akan mengganggu dalam proses amplifikasi. Oleh karena itu primer yang dipilih adalah primer dengan jumlah ikatan G-C yang paling sedikit untuk menghindari adanya struktur dimer (Zerazat *et.al.* 2023).

Struktur sekunder primer dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas produk PCR, karena akan mengurangi kemampuan primer menempel pada cetakan. Menurut Messe, Y *et.al.* (2020) dalam mendesain primer penting untuk meminimalkan adanya

primer *dimmer* dan primer *hairpin*. Hairpin adalah salah satu struktur sekunder yang sebaiknya dihindari dalam mendesain primer, namun sangat sulit untuk memperoleh primer yang tidak membentuk struktur hairpin atau loop (Pratiwi, A *et.al.* 2015). Selanjutnya pasangan primer yang sesuai dengan kriteria primer yang baik diuji spesifisitas secara *in silico* menggunakan Primer-BLAST (Padhi *et al.* 2020). Primer BLAST digunakan untuk mendesain primer spesifik target. Primer menjadi faktor penting dalam proses pengamplifikasi. Primer akan menemukan target gen spesifik sehingga dapat diamplifikasi dan diidentifikasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa sekuen spesifik primer *forward* adalah 5'-GAGTTCGGAGCTTTGCCT-3' dan *reverse* 5'AGCCCACCATGATTTTCAGC-3' dan di uji spesifisitasnya berdasarkan database *Refseq representative genomes* menunjukkan bahwa primer secara spesifik menempel pada *chromosome* 13 yang merupakan lokasi Gen *EDNRB* (13q22) dengan panjang produk 879 bp.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Terimakasih kepada dosen pembimbing saya yang telah membimbing dalam mengerjakan artikel ini hingga selesai.

Daftar Pustaka

- Amiel, J., Attie, T., Jan, D., Pelet, A., Edery, P., Bidaud, C., Lacombe, D., Tam, P., Simeoni, J., Flori, E., Nihoul-Fekete, C., Munnich, A., & Lyonnet, S. (1996). Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Human Molecular Genetics*, 5(3), 355–357. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.3.355>
- Bedwell, M. E., & Goldberg, C. S. (2020). Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. *Ecology and Evolution*, 10(3), 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ece3.6014>
- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134-136.
- Emison ES, Garcia-Barcelo M, Grice EA, Lantieri F, Amiel J, Burzynski G, Fernandez RM, Hao L, *et al.* 2010. Differential Contributions of Rare and Common, Coding and Noncoding RET Mutations to Multifactorial Hirschsprung Disease Liability. *Am J Hum Genet.* ; 87(1): 60–74.
- Fadista J, Lund M, Skotte L, Geller F, Nandakumar P, Chatterjee S, Matsson H, Granström AL. (2018). Genome-wide association study of Hirschsprung disease detects a novel low-frequency variant at the RET locus. *Eur J Hum Genet.*; 26(4): 561–569.
- Farikh, M., Pastha, R. W., Alridho, R. R., Nafisah, A. Z., Ramadhan, B. F., & Achyar, A. (2023). Multiple Alignment and Primer Design for Groups of Barnacle Organisms and Amphibalanus amphitrite as Biofouling Markers. *Bulletin of Scientific Contribution*, 7(2), 55. <https://doi.org/10.24036/bsc.v7i2.125392>

- Karim, A., Tang, C. S.M., & Tam, P. K.H. (2021). The emerging genetic landscape of hirschsprung disease and its potential clinical applications. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 638093. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.638093>
- Klein, M., & Varga, I. (2020). Hirschsprung's Disease-Recent Understanding of Embryonic Aspects, Etiopathogenesis and Future Treatment Avenues. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56 (11). <https://doi.org/10.3390/medicina56110611>
- Kyrklund K, Sloots CEJ, Blaauw I, Bjornland K, Rolle KU, Cavalieri D, Paola Francalanci P, Fabio Fusaro F, *et al.* 2020. ERNICA guidelines for the management of rectosigmoid Hirschsprung's disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 15:168:2-16
- Maitriani, L. K. B., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2015). Desain primer untuk amplifikasi fragmen gen inhA isolat 134 multidrug resistance tuberculosis (MDR-TB) dengan metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 3(2), 89-96.
- Messe, Y., Budiarsa, I. M., & Laenggeng, A. H. (2020). Desain Primer Polymerase Chain Reaction (PCR) secara In Silico untuk Amplifikasi Gen gyrA Extensively Drug Resistant Tuberculosis (XDR- TB). *Journal of Biology Science and Education*, 8(2), 616-622.
- Padhi, B. K., Pelletier, G., & Shwed, P. S. (2020). A bioinformatics workflow for the evaluation of RT-qPCR primer specificity: Application for the assessment of gene expression data reliability in toxicological studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 111, 104575. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104575>
- Pranata, A., & Ahda, Y. (2021). Desain Primer Untuk Identifikasi Gen Luciferase pada Kunang-Kunang Genus Lamprigera (Lampyridae: Coeloptera). In *Prosiding Seminar Nasional Biologi* (Vol. 1, No. 2, pp. 1739-1747).
- Pratiwi, A. Rafika, S. Pratiwi A. (2015). Optimasi suhu desain primer gen blaZ resistensi pada bakteri Staphylococcus aureus secara in silico. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1).
- Tam PKH, Garcia-Barcelo M. (2009). Genetic basis of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*.25(7):543–58.
- Torroglosa, A., Villalba-Benito, L., Luzon-Toro, B., Fernandez, R. M., Antinolo, G., & Borrego, S. (2019). Epigenetic mechanisms in hirschsprung disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13).<https://doi.org/10.3390/ijms20133123>
- Wang Y, Jiang Q, Cai H, Xu Z, Wu W, Gu B, Li L, Cai W. 2020. Genetic variants in *RET*, *ARHGEF 3* and *CTNNAL1*, and relevant interaction networks, contribute to the risk of Hirschsprung disease. *Aging (Albany NY)*; 12(5): 4379–4393
- Wardi, E. S., Syukur, S., Chaidir, Z., Jamsari, J., & Sartika, D. (2021). Desain Primer Dan Deteksi Gen CHS (chalcone synthase) Pada Tanaman Gambir (Uncaria gambir (Hunter) Roxb.) Tipe Riau Gadang. *Rafflesia Journal Of Natural And Applied Sciences*, 1(1), 29–39. <https://doi.org/10.33369/rjna.v1i1.15591>
- Wei, F., Ge, Y., Li, W., Wang, X., & Chen, B. (2020). Role of endothelin receptor type B (EDNRB) in lung adenocarcinoma. *Thoracic Cancer*, 11(7), 1885–1890. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13474>
- Widowati, T., Melhem, S., Patria, S. Y., de Graaf, B. M., Sinke, R. J., Viel, M., Dijkhuis, J., Sadewa, A. H., Purwohardjono, R., Soenarto, Y., Hofstra, R. M., & Sribudiani, Y. (2016). RET and EDNRB mutation screening in patients with Hirschsprung disease: Functional studies and its implications for genetic counseling. *European Journal of Human Genetics*, 24(6), 823–829. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.214>

- Wu Q, Zhao J, Zheng Y, Xie X, He Q, Zhu Y, Wang N, Huang L, Lu L, Hu T, Zeng J, Xia H, Zhang Y, Zhong W. 2021. Associations between common genetic variants in microRNAs and Hirschsprung disease susceptibility in Southern Chinese children. *J Gene Med.* 23(2): e3301
- Zerazat, Z., & Farma, S. A. (2023). In Silico Primer Design for Superoxide Dismutase1 (Sod 1) Gene Amplification in *Rattus norvegicus*. *Natural Science: Journal of Science and Technology*, 12(2)