

# In Silico Primer Design For Chicken ND5 Gene Amplification By Real Time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR)

## Desain Primer Secara In Silico Untuk Amplifikasi Gen ND5 Ayam Dengan Real Time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR)

Fira Safitri<sup>1</sup>, Afifatul Achyar<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

<sup>2</sup> Department of Environmental Sciences, Faculty of Human and Environment, Sumatra University, West Sumatera, Indonesia

\*Correspondence author: [afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id](mailto:afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id)

### Abstract

Animal food in the form of meat is one of the sources of protein that is widely eaten by Indonesians, such as chicken meat. One of the problems faced by consumers is the possibility of fraud and adulteration of food products made from chicken meat. Molecularly, we can detect what meat components are used as basic ingredients in products made from chicken meat using RT-PCR techniques. This study aims to design Gallus-specific primers, test the specificity of the designed primers in silico and in vitro. This research is a descriptive study. Primers were designed using Genious Prime and Primer BLAST on NCBI (National Center for Biotechnology Information). In silico primer specificity test was conducted by conducting primer BLAST through NCBI database. The results obtained a pair of Gallus-specific primers, a forward primer with the sequence 5'-TCACCCA CCCAAACCAACA-3' and a reverse primer with the sequence 5'-GGTGGGTGCGGATGAGTAAA-3' designed on mitochondrial DNA, namely the ND5 gene (NADH dehydrogenase subunit 5) with a product size of 189 bp. Primer blasting on GenBank (NCBI) showed that the designed primers were able to attach specifically only to Gallus

**Key words** Please provide 5 words or phrases separated by comma

### Abstrak

Makanan hewani berbentuk daging merupakan salah satu sumber protein yang banyak dimakan oleh masyarakat Indonesia seperti misalnya daging ayam. Salah satu permasalahan yang dihadapi oleh konsumen adalah kemungkinan adanya kecurangan dan pemalsuan produk makanan yang berbahan dasar daging ayam, Secara molekuler kita dapat mendeteksi komponen-komponen daging apa saja yang dijadikan bahan dasar dalam produk yang berbahan dasar daging ayam menggunakan teknik RT-PCR. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer spesifik Gallus, menguji spesifisitas primer hasil desain secara *in silico* dan *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Primer dirancang menggunakan Genious Prime dan Primer BLAST pada NCBI (National Center for Biotechnology Information). Uji spesifisitas primer in silico dilakukan dengan melakukan primer BLAST melalui database NCBI. Hasil penelitian memperoleh sepasang primer spesifik Gallus, primer forward dengan sekuen 5'-TCACCCA CCCAAACCAACA-3' dan primer reverse dengan sekuen 5'-GGTGGGTGCGGATGAGTAAA-3' yang dirancang pada DNA mitokondria yaitu gen ND5 (NADH dehidrogenase subunit 5) dengan ukuran produk 189 bp. Primer diBlasting pada GenBank (NCBI) menunjukkan bahwa primer yang dirancang mampu menempel secara spesifik hanya pada Gallus

**Kata kunci** Desain primer, gen ND5 Gallus, RT-PCR

### Pendahuluan

Pertambahan jumlah penduduk yang semakin meningkat, menyebabkan kebutuhan pangan juga semakin bertambah, Pangan merupakan kebutuhan pokok manusia yang sangat penting untuk meningkatkan kesehatan, agar manusia dapat menjalankan aktivitas sehari-hari dengan baik. Oleh karena itu, keamanan

pangan menjadi sangat penting agar tidak terjadi gangguan kesehatan yang tidak diinginkan. Namun akhir-akhir ini banyak beredar makanan di masyarakat yang tidak lagi terjamin keamanannya (Achyar, In press). Makanan hewani berbentuk daging merupakan salah satu sumber protein yang banyak dimakan oleh masyarakat Indonesia seperti misalnya daging ayam (Lisdiani & Annisa, 2022). Daging dan produk daging ayam merupakan komponen penting dan besar dari makanan manusia, kualitasnya menjadi perhatian konsumen, pihak berwenang, pengolah dan pengecer. Permintaan yang tinggi untuk daging dan produk-produk daging ayam disertai dengan biaya mereka yang meningkat membuatnya rentan terhadap pemalsuan, substitusi, dan kecurangan lainnya (Amalia et al., 2020). Menurut Lembaga Pengujian Pangan Obat-obatan dan Kosmetik Majelis Ulama Indonesia (LPPOM MUI) kasus kecurangan yang terjadi pada produk pangan asal daging ayam, yaitu dilution, substitution, concealment, mislabeling, unapproved enhancement, counterfeiting dan yang terakhir grey market production.

Teknik yang sudah banyak digunakan untuk analisis kehalalan suatu produk adalah Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Teknik tersebut dianggap valid karena dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies termasuk turunan unggas secara molekuler dari level asam deoksiribonukleat (DNA). Di samping itu, kelebihan teknik PCR antara lain memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi jika dibandingkan dengan teknik lainnya (Fakih et al., 2021). Desain primer merupakan langkah awal dalam melakukan amplifikasi dan analisis segmen DNA. Desain primer dilakukan guna memperoleh primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi DNA dengan metode polymerase chain reaction (PCR). Keberhasilan amplifikasi DNA tergantung pada ketepatan primer yang digunakan (Diss, 2003). Primer yang digunakan dalam proses PCR harus dapat membatasi daerah yang akan diamplifikasi. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Amplifikasi DNA dengan metode PCR terdiri dari tiga tahap. Tahap awal dari proses tersebut adalah untai DNA, selanjutnya dilakukan penempelan primer pada fragmen DNA target (annealing) dan tahap akhir merupakan proses extension yaitu proses pemanjangan sekuen DNA (Sulistyaningsih, 2007). Perancangan untuk memperoleh suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi dilakukan secara *in silico*, yaitu merancang/mendesain primer dengan bantuan suatu program dalam komputer.

Penelitian ini dilakukan desain primer dengan spesifik genus sekuen gen ND5 pada ayam. Gen ND5 merupakan gen pengkode rantai 5 NADH-ubiquinone oxidoreductase, yang terletak di membran dalam mitokondria dan merupakan yang terbesar dari lima kompleks rantai transpor elektron. Kelebihan dari menggunakan gen ND5 yang terdapat pada genome mitokondria sebagai target adalah karena gen ini memiliki salinan yang lebih banyak sehingga akan lebih mudah terdeteksi (Masnaini, 2021). Untuk spesifik genus *Gallus* gen ND5 terdapat 5 spesies diantaranya *Gallus gallus*, *Gallus gallus spadiceus*, *Gallus lafayetti*, *Gallus varius* dan *Gallus sonnerati*. Dari kelima spesies tersebut akan di desain primer spesifik genus *Gallus*.

## Bahan dan Metode

### Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif, dilakukan pada bulan November sampai dengan Februari 2023 di Laboratorium Genetika Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Negeri Padang (UNP), Air Tawar Barat, Kota Padang, Provinsi Sumatera Barat.

### Metode Penelitian

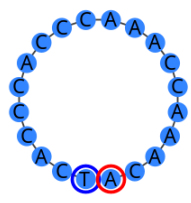
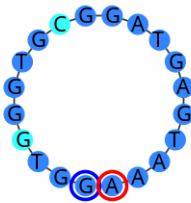
Pada penelitian ini dilakukan desain primer spesifik genus *Gallus* menggunakan *software* Geneious Primer. Primer spesifik dirancang pada daerah mitokondria yaitu gen *ND5* (NADH dehidrogenase subunit 5). Tahapan awal desain primer yaitu dengan menentukan gen target di *Gene Bank National Center For Biotechnology* (NCBI). Primer yang didesain harus memenuhi kriteria primer ideal dengan panjang nukleotida 18-20 bp, selisih  $T_m$  (*melting temperature*) antara primer *forward* dan *reverse* tidak lebih dari 5° C, dan tidak membentuk stuktur sekunder (*hairpin* atau *self dimer*). Semua sequence ND5 dimultiple alignment, kemudian dipilih daerah yang *conserved* (Lestari) untuk salahsatu primer dan daerah yang spesifik genus untuk primer lainnya. Posisi penempelan primer juga memperhatikan ukuran ampikon yang berbeda untuk tiap genus.

## Hasil dan Pembahasan

Hasil dari *multiple alignment* sekuen gen ND5 Genus *Gallus* didapatkan satu pasang kandidat primer. Pasangan primer tersebut diberi nama *Gallus F* dengan urutan sekuen 5'-TCACCCACCCAAACCAACA-3'

dan Gallus R dengan urutan sekuen 5'-GGTGGGTGCGGATGAGTAAA-3'. Primer diuji secara *in silico* menggunakan *software* Genius Prime untuk memastikan primer yang telah didesain sudah memenuhi standar kriteria yang ideal untuk proses amplifikasi dimesin PCR secara *in vitro*

**Tabel 1.** Karakteristik Primer Gallus F dan Gallus R.

Karakteristik Primer	Ukuran Amplikon	DNA Fold
<b>Gallus F</b> Sequence (5' to 3') TCACCCACCCAAACCAACA Type : Primer Length: 20 %GC: 50.0 Tm: 59.96 Hairpin Tm: None Self Dimer Tm: None	189 bp	
<b>Gallus R</b> Sequence (5' to 3') GGTGGGTGCGGATGAGTAAA Type: Primer Length: 55.0 %GC: 20 Tm: 55.0 Hairpin Tm: None self Dimer Tm: None		

Kriteria parameter yang baik yaitu memiliki panjang nukleotida 18–24bp, memiliki suhu (Tm) 50–60 oC (Badriyya & Achyar, 2021. Kandungan %GC tiap primer harus berada pada kisaran 40–60%(Syamsurizal et al., 2020). Suhu annealing PCR akan dipengaruhi oleh kandungan %GC(Guanin(G) dan sitosin (C)) yang memiliki tiga ikatan hidrogen karena itu membutuhkan banyakenergi dan panas untuk memutuskannya (Putri & Wahyuni, 2019). Primer Gallus mengamplifikasi panjang produk PCR 189 bp dengan menunjukkan primer *forward* memiliki panjang 20 basa dan primer *reverse* 20 basa, jika nanti ketika dilakukan elektroforesis dan terdapat pita di bawah panjang produk , menandakan adanya dimer. Dimer menandakan kurangnya konsentrasi DNA cetakan pada reaksi PCR (Ahda et al., 2012).. %GC dari pasangan primer ini masing-masing 50% dan 55%. Selisih Tm primer antara *forward* dan *reverse* adalah 5°C. Pada pasangan primer *forward* dan *reverse* tidak terdapat *secondary structure*

**Uji Spesifisitas Primer secara *in silico***

Spesifisitas pasangan primer dicek secara *in silico* menggunakan PrimerBLAST NCBI. Hasil PrimerBLAST pasangan primer terangkum pada Tabel berikut.

Target Template	Deteksi Target
<i>Gallus gallus</i>	Ya
<i>Gallus gallus spadiceus</i>	Ya
<i>Gallus lafayetii</i>	Ya
<i>Gallus varius</i>	Ya
<i>Gallus sonneratii</i>	Ya
<i>Brachyura</i>	Tidak
<i>Salmo salar</i>	Tidak
<i>Scomberomorini</i>	Tidak
<i>Bos taurus</i>	Tidak
<i>Caridea</i>	Tidak

Dari tabel, terlihat bahwa pasangan primer mengamplifikasi *Gallus gallus*, *Gallus gallus spadiceus*, *Gallus lafayetii*, *Gallus varius*, *Gallus sonneratii*, dan tidak dapat mengamplifikasi *Brachyura*, *Salmo salar*, *Scomberomorini*, *Bos taurus*, *Caridea*.

## Ucapan Terima Kasih

Alhamdulillah puji syukur kepada Allah SWT telah terlaksana dan selesainya penelitian ini dengan lancar. Terimakasih kepada kedua orang tua yang selalu memberikan doa dan dukungan dan terimakasih kepada tim studi genetics UNP yang telah membantu dan memberi dukungan pada penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Achyar, A., Putri, A. I., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, in silico PCR and optimum annealing temperature for Escherichia coli detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52-60
- Achyar, A., Chatri, M., Khairiyah, L. 2023. Optimalisasi Multiplex PCR untuk Deteksi Produk Makanan Berbasis Daging Sapi Terkontaminasi Daging Tikus. *Proceeding 4th ICOMSET in conjunction 3rd IcoBioSE 2021*. Atlantis Press. (In Press)
- Ahda, Y., Muharni, I. R., & Putri, D. H. (2012). Kualitas DNA hasil isolasi dari beberapa bagian batang rambut untuk bahan analisis DNA forensik. *EKSAKTA*, 1.
- Amalia, L., Army Trimelati, D., Teknologi Pangan, M., Pascasarjana, S., Djuand, U., Pangan dan Gizi, T., & Ilmu Pangan Halal, F. 2020. Analisis Kehalalan Daging Sapi Dengan Metode Pork Detection Kit (Pdk) Dan Tingkat Kepedulian Konsumen Dalam Mengonsumsi Daging Sapi Halal. *Jurnal Ilmiah Pangan Halal*, 2(2), 53.
- Diss, T. 2003. The Polymerase Chain Reaction. In Crocker, J., & Paul, G.M. editors. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. United Kingdom: John Willey and Sons, Ltd. P. 193-210
- Fakih, T. M., Wijaya, S., & Priani, S. E. 2021. Desain Primer Gen 12S rRNA dari DNA Mitokondria Babi (*Sus scrofa*) secara In Silico sebagai Kandidat Primer dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(3), 316. <https://doi.org/10.25077/jsfk.8.3.316-322.2021>
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. 2000. Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. In *Unitas* (Vol. 9, Issue 1).
- Lisdiani, N. L. I., & Annisa, A. A. 2022. Pengaruh Harga, Kualitas Produk dan Pengetahuan Halal Terhadap Keputusan Pembelian Produk Fiesta Chicken Nugget dengan Minat Beli Sebagai Variabel Intervening. *Invest Journal of Sharia & Economic Law*, 2(1), 79-91. <https://doi.org/10.21154/invest.v2i1.3830>
- Masnaini. 2021. "Desain dan Optimasi Metode PCR Untuk Deteksi Kontaminasi Daging Tikus pada Sampel Makanan", *Skripsi*, 56 Hal., Universitas Negeri Padang, Padang, Indonesia, Agustus 2021.
- Putri, D. H., & Wahyuni, W. (2019). Primer Design For Identification Of Beta-Carotene Encoding Genes In Cassava. *Serambi Biologi*, 4
- Soni Muhsinin, Maria Martina Sulastri, dan D. S. 2018. *Deteksi Cepat Gen InvA pada Salmonella spp. Dengan Metode PCR*. 5, 191-200.
- Syamsurizal, S., Saputra, H., Putri, D. H., & Badriyya, E. (2020). Primers Designed For Amplifying TCF7L2 Gen. *Jurnal Biota*, 6(2), 63-70.