



Desain Primer Secara *in Silico* untuk Amplifikasi Gen TGF- β 1 dan TNF- α pada Mencit *Mus Musculus* Sebagai Kandidat Primer dalam Uji qRT-PCR

Annisa Nurul Ilmi^{*1}, Aloysia Sri Pujiyanti², Amirullah³

^{1*}Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman,
Jl. Kuaro, Gn. Kelua, Kec. Samarinda Ulu, Kota Samarinda, Kalimantan Timur 75242. Telp.: 0541-749152
Annisanurulilmi@fmipa.unmul.ac.id*

²Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman, Samarinda

³Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo, Kendari

Diterima: 22 Mei 2025 – Disetujui: 30 Mei 2025 – Dipublikasi: 31 Mei 2025

ABSTRAK

Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan dua gen penting yang terlibat dalam mekanisme inflamasi dan fibrosis. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain kandidat primer spesifik bagi kedua gen tersebut pada hewan model Mencit *Mus musculus* secara *in silico* sebagai persiapan uji ekspresi gen menggunakan metode qRT-PCR. Desain primer dilakukan menggunakan software Primer3Plus, Clone Manager Professional 9 Demo, Primer Express, dan OligoAnalyzer untuk mengevaluasi parameter kualitas primer seperti *melting temperature* (T_m), %GC, struktur sekunder (hairpin dan dimer), serta nilai ΔG . Analisis spesifisitas dilakukan menggunakan Primer-BLAST NCBI untuk memastikan bahwa primer hanya menempel pada target genom *Mus musculus*. Hasil menunjukkan bahwa kandidat sekuens terbaik yakni primer TGF- β 1 forward 5' ATTCCTGGCGTTACCTTGG 3'; reverse 5' GTGAGCGCTGAATCGAAAG 3' dengan produk ampikon 137 bp dan primer TNF- α forward 5' TGCTCTGTGAAGGGAATGG 3'; reverse 5' TTGGACCCTGAGCCATAATC 3' dengan hasil produk 146 bp. Kandidat primer memiliki panjang 19–20 nukleotida, %GC antara 50–55% dan T_m tidak lebih dari 60°C. Tidak ditemukan struktur sekunder baik hairpin atau dimer, dengan nilai $\Delta G > -3$ kcal/mol, menandakan primer stabil. Hasil Primer-BLAST mengonfirmasi bahwa kedua pasangan primer bersifat spesifik terhadap gen target pada *Mus musculus* dengan nilai 100% sehingga pasangan primer ini layak sebagai kandidat primer untuk aplikasi qRT-PCR dalam studi ekspresi gen terkait inflamasi. Validasi lanjutan di laboratorium tetap diperlukan untuk melakukan reaksi qRT-PCR dengan baik.

Key words: desain primer, qRT-PCR, TGF- β 1, TNF- α , *Mus musculus*

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan respons fisiologis kompleks terhadap gangguan homeostasis seperti infeksi, trauma jaringan, atau rangsangan imunologis. Proses ini dimediasi oleh berbagai molekul bioaktif, termasuk sitokin pro-inflamasi dan anti-inflamasi, yang berperan penting dalam mengatur intensitas dan durasi respons imun. Ada banyak gen yang terlibat pada jalur persinyalan inflamasi, namun dua gen yang secara luas dikaji dalam mekanisme inflamasi adalah *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β 1) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α).

TGF- β 1 adalah sitokin yang multifungsi yang mengendalikan berbagai respon seluler seperti pertumbuhan sel, proliferasi sel, diferensiasi sel, perbaikan jaringan dan pengaturan sistem kekebalan tubuh terutama dalam reaksi inflamasi dan fibrogenesis. Jika diekspresikan terlalu banyak, TGF- β 1 bisa menyebabkan fibrosis dan penyakit inflamasi kronis (Rahmadona et al., 2023; Trihono, 2016). Penelitian menunjukkan bahwa kadar TGF- β 1 dianggap sebagai biomarker penting yang terlibat dalam

sejumlah penyakit, termasuk penyakit kardiovaskular, rinositis, penyakit ginjal dan gangguan autoimun (Apriansyah et al., 2020; Battaglia et al., 2010; Dantas et al., 2016; Gómez-Bernal et al., 2023; Karadeniz et al., 2022; Rahmadona et al., 2023).

Sedangkan TNF- α merupakan sitokin pro-inflamasi yang memiliki peran sentral dalam mengatur respons imun, terutama pada proses peradangan dan autoimun. TNF- α berfungsi dalam merekrut sel-sel imun ke lokasi peradangan serta menginduksi produksi berbagai mediator inflamasi lainnya, sehingga memperkuat respons imun tubuh (Beutler, 1999). Namun, produksi TNF- α yang berlebihan atau tidak terkontrol dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan memperburuk kondisi penyakit inflamasi. Beberapa studi menunjukkan bahwa peningkatan kadar TNF- α berkaitan dengan perkembangan penyakit degeneratif seperti osteoporosis, serta kerusakan jaringan yang terjadi pada penyakit autoimun seperti Lupus Eritematosus Sistemik (Tonny et al., 2018). Peningkatan ekspresi TNF- α berkontribusi pada kerusakan mukosa usus pada *Inflammatory Bowel Diseases* (IBD), disfungsi endotelial dan peningkatan peradangan di dinding pembuluh darah, serta merangsang proliferasi sel tumor dalam beberapa jenis kanker seperti kanker usus (Cai et al., 2020; Muthusami et al., 2021; Ruder et al., 2019; Villanacci et al., 2019).

Analisis ekspresi gen melalui *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menjadi metode unggulan (*Gold standard*) dalam penelitian imunologi dan inflamasi karena sensitivitas tinggi, spesifisitas baik, dan rentang kuantifikasi luas. Keberhasilan RT-qPCR sangat dipengaruhi oleh kualitas primer diantaranya suhu leleh (T_m) yang tepat, komposisi GC seimbang, serta minimalnya struktur sekunder seperti *hairpin* atau dimer. Desain primer *in silico* menggunakan software seperti Primer-BLAST (NCBI) dan Primer3plus, untuk mempercepat identifikasi kandidat primer yang memenuhi kriteria termodinamik dan spesifisitas genomik (Hung & Weng, 2016)

Meskipun desain primer *in silico* telah banyak diterapkan untuk berbagai target gen dan membahas berbagai kriteria yang baik untuk mendesain primer, belum ada studi sistematis yang khusus merancang primer untuk TGF- β 1 dan TNF- α khususnya pada hewan uji Mencit *Mus musculus*. Primer yang disesuaikan dengan genom mencit sangat penting untuk menjamin akurasi dan konsistensi hasil pengukuran ekspresi gen dalam penelitian inflamasi dengan hewan model. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain kandidat primer RT-qPCR spesifik gen target terkait inflamasi TGF- β 1 dan TNF- α pada *Mus musculus* secara *in silico*. Pada penelitian ini dilakukan analisis struktur *hairpin* dan nilai ΔG pada desain primer yang digunakan untuk menilai kestabilan dan spesifitas penempelan primer, dimana belum banyak dibahas mendalam pada penelitian terkait desain primer. Diharapkan penelitian *in silico* ini dapat menjadi acuan bagi penelitian molekuler lanjutan di bidang imunologi dan patofisiologi khususnya yang menggunakan hewan uji *Mus musculus* serta memperkuat pengembangan metode diagnostik berbasis ekspresi gen.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dikerjakan secara *in silico* pada bulan Maret – April 2025 di Laboratorium Biologi Dasar, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman dengan menggunakan beberapa tools/software di antaranya program primer3 plus, Oligo Analyzer, Clone Manager Professional 9 Demo, dan Primer Express. Adapun bahan penelitian berupa sekuen gen-gen target

inflamasi TGF- β 1 dan TNF- α diunduh dari GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Primer Gen

Urutan nukleotida dari Gen pengkode TGF- β 1 dan TNF- α diambil dari database GenBank NCBI, dan dipilih sekuens yang berasal dari *full length messenger Ribonucleic Acid (mRNA)* yang diisolasi dari *mus musculus*. Sebagai cetakan untuk mendesain primer, digunakan TGF- β 1 (kode genbank: NM_011577.2) dan TNF- α (Kode genbank: NM_013693.3) yang dapat diunduh pada situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

Software dan tools desain primer secara *in silico*

Software yang digunakan pada penelitian desain primer secara *in silico* yaitu program Clone Manager Professional 9 Demo dan Primer Express (thermo fisher), untuk memvalidasi kualitas kandidat primer. *Tools* lain yang digunakan untuk memilih sekuens kandidat primer yaitu melalui website NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Primer 3 plus <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> serta Oligo Analyzer <https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> untuk mengetahui nilai ΔG (delta G) dan struktur sekunder (*hairpin*) dari kandidat primer.

Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis melalui beberapa tahap. Pertama, sekuens gen TGF- β 1 dan TNF- α (*Mus musculus*) diunduh dari database GenBank NCBI dalam format FASTA. Kemudian dilakukan identifikasi dan pemilihan wilayah konservatif pada sekuens gen yang berpotensi menjadi lokasi penempelan primer. Perancangan primer dibuat menggunakan layanan Primer3Plus dan NCBI dengan parameter yang disesuaikan untuk kebutuhan qRT-PCR. Terakhir, kualitas primer seperti struktur sekunder primer (*forward* dan *reverse*) dievaluasi menggunakan Clone Manager Professional 9 Demo dan Primer Express, meliputi potensi pembentukan primer-dimer, analisis struktur *hairpin* (nilai ΔG) yang dianalisis secara lanjut dengan Oligo Analyzer, serta penilaian kestabilan ujung 3'. Munculnya teks berwarna merah pada Clone Manager Professional 9 Demo mengindikasikan adanya masalah pembentukan dimer primer, menandakan bahwa primer tersebut tidak memenuhi semua kriteria. Sebaliknya, apabila tidak ada teks merah (indikator “yes”) menandakan primer memenuhi kriteria.

Analisis Spesifitas Primer

Spesifitas primer dievaluasi untuk memastikan kemampuannya mengidentifikasi dan berikatan secara eksklusif dengan gen target. Analisis ini dilakukan dengan menjalankan pencocokan sekuens kandidat primer menggunakan BLAST di NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), dimana setiap pasang primer akan dibandingkan terhadap kumpulan data sekuens multi-organisme di basis GenBank. Hasil identitas persentase menunjukkan tingkat kesesuaian primer terhadap gen TGF- β 1 dan TNF- α dimana nilai persentase yang lebih tinggi mengindikasikan tingkat spesifitas yang lebih baik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain Primer TGF- β 1 dan TNF- α

Analisis ekspresi mRNA (*messenger Ribonucleic Acid*) menggunakan teknik qRT-PCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) merupakan pendekatan yang sangat efektif untuk mengukur kuantitas RNA pada sel atau jaringan tertentu. Metode ini memiliki peran krusial dalam

penelitian TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*) dan TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), mengingat kedua sitokin tersebut berfungsi sebagai mediator utama dalam mekanisme inflamasi dan fibrosis. Tahap paling awal adalah mencari database gen TGF- β 1 dan TNF- α yang ada pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). NCBI menyajikan data genomik komprehensif yang diakses secara luas diakses untuk penelitian bioinformatika (Rangwala et al., 2021).

Sekuens gen target menggunakan sekuens *full length* mRNA *mus musculus*, karena desain primer ini bertujuan untuk mengkuantifikasi ekspresi gen sehingga tidak disarankan mengambil sekuens dengan jenis parsial dan bukan berasal dari mRNA ataupun cDNA (*DNA komplementer*). Selanjutnya menyimpan nomor akses (*accession number*) gen tersebut dari NCBI. Nomor akses merupakan kode unik yang digunakan untuk mengenali tiap entri sekuens, mulai dari genom dan mRNA hingga produk protein dalam database NCBI. Setelah mendapatkan nomor akses dari NCBI, selanjutnya menginput sekuens dalam format FASTA ke dalam NCBI dan juga Primer 3 Plus untuk mendapatkan berbagai kandidat primer. Sekuens diambil dari primer 3 plus yang dapat dilihat pada **gambar 1**.

Gambar 1. Hasil dari salah satu primer yang dianalisis dengan Primer 3 Plus

Program Primer 3 Plus memberikan dan 5 pilihan pasang primer untuk TGF- β 1 dan 8 pasang primer untuk TNF- α setelah dimasukkan beberapa kriteria seperti ukuran primer yaitu 18-22 oligonukleotida dengan hasil produk maksimal 300 bp. Sedangkan pada situs NCBI memberikan 10 pilihan pasang primer pada tiap gen dengan kriteria yang sama. Parameter yang dianalisis oleh Primer 3 plus meliputi panjang basa, ukuran produk PCR, *melting temperature* (T_m), %GC, *hairpin*, *repeats*, *runs*, dan *false priming*, *self-dimer* dan *pair-dimer*. Dari beberapa kandidat primer pada masing-masing gen yang dianalisis oleh berbagai *tools*, dipilih sekuens terbaik berdasarkan hasil analisis berbagai kriteria primer berkualitas untuk qRT-PCR yang telah dirangkum pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil desain primer TGF- β 1 dan TNF- α pada *Mus musculus*

Gen Target	Primer	Sekuens	Panjang (bp)	Tm (°C)	%GC	Amplicon (bp)	Hairpin/ ΔG (kcal/mol)	Start
TGF- β 1	Forward	ATTCCTGGCGTT ACCTTGG	19	59.9	53	137	1.01	1397
	Reverse	GTGAGCGCTGAA TCGAAAG	19	59.7	55		1.19	1533
TNF- α	Forward	TGCTCTGTGAAG GGAATGG	20	59.8	50	146	0.86	846
	Reverse	TTGGACCCTGAG CCATAATC	20	59.9	55		2.9	1141

qRT-PCR menggunakan primer *forward* dan *reverse* untuk sintesis DNA dua arah, menghasilkan amplifikasi yang spesifik, cepat, lebih efisien, dan secara eksponensial. Primer forward menempel pada untai antisense pada ujung 3' untuk memperpanjang untai sense, sedangkan primer reverse menempel pada untai sense untuk memperpanjang untai antisense (Eling KS et al., 2014). Kedua primer bekerja sama menggandakan target setiap siklus. Tanpa salah satu primer, amplifikasi eksponensial tidak dapat terjadi. Desain primer untuk qRT-PCR harus memenuhi beberapa kriteria agar amplifikasi target berlangsung akurat, spesifik, dan efisien. Idealnya, primer berukuran 18–24 basa, sehingga menghasilkan amplicon atau produk sepanjang 80–150 bp yang mendukung kinerja reaksi (Patel & Sarma, 2018).

Ukuran sekuens kandidat primer gen TGF- β 1 dan TNF- α yang diperoleh adalah 19-20 pasang basa. Panjang basa 18-30 bp merupakan panjang primer yang dianggap ideal untuk amplifikasi dengan metode PCR, karena primer dengan panjang kurang dari 18 basa berisiko tinggi mengalami *mispriming*, sehingga menurunkan spesifitas dan menghasilkan produk yang tidak sesuai. *Mispriming* adalah kondisi ketika primer menempel pada lokasi yang tidak diinginkan dalam DNA target dan menyebabkan terjadinya *false positive* atau positif palsu (Sunarno et al., 2018). Jika sekuens primer didesain lebih dari 30 basa, dapat menyebabkan primer tidak spesifik menempel ke gen target karena terjadi hibridisasi dengan primer lain sehingga tidak dapat terjadi amplifikasi.

Selain ukuran primer, hasil produk PCR atau amplicon juga perlu diperhatikan. Kandidat primer yang dipilih yaitu primer yang memiliki hasil produk kurang dari 200 bp yakni 137 bp untuk TGF- β dan 146 bp untuk TNF- α . Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Debode et al. (2017) menggunakan RT-PCR, hasil menunjukkan bahwa semakin kecil produk hasil amplifikasi yang dihasilkan maka semakin tinggi sinyal fluoresensi yang dihasilkan. Sehingga, sangat penting mendesain primer untuk RT-PCR dengan amplicon yang kecil (70–200 bp) agar meningkatkan efisiensi dan sensitivitas deteksi.

Suhu leleh (*melting temperature/T_m*) primer yang didesain berada dalam kisaran 55°C hingga 60°C (Primer 3 plus), dengan selisih *T_m* antara primer forward dan reverse tidak melebihi 5°C. Suhu leleh (*T_m*) primer sebaiknya antara 55–65 °C agar sekuens menempel kuat pada cDNA target tanpa menyebabkan pembentukan dimer (Chauhan et al., 2019). Pada penelitian ini, primer didesain dengan memastikan bahwa komposisi GC atau nilai *GC content* berada pada rentang 50-60%. Hasil analisis dengan primer 3 plus dan NCBI diperoleh bahwa kandidat primer yang dipilih memiliki komposisi GC 50-55% namun sedikit berbeda dengan hasil analisis dengan software lain seperti pada Clone Manager Professional 9 Demo yang bisa dilihat pada **gambar 2 (a)**. Semua kandidat primer dari Primer 3 plus dan NCBI dianalisis lebih lanjut dengan Clone Manager Professional 9 Demo, jika ada salah satu pasangan primer yang tidak memenuhi kriteria seperti munculnya satu atau lebih tulisan “no” pada kriteria di kotak dialog, maka primer tersebut tidak akan dipilih menjadi kandidat seperti pada **gambar 2 (b)**.

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria	Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	50	Yes	% GC	Range 50-60	50	Yes
Tm°C	Range 55-80	59	Yes	Tm°C	Range 55-80	61	Yes
3' Dimers	< 3 matches at 3' end	1	Yes	3' Dimers	< 3 matches at 3' end	1	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	2	Yes	Dimers-Any	< 7 adj homol bases	2	Yes
Stability	>= 1.2 kJals 5' vs 3'	1.6	Yes	Stability	>= 1.2 kJals 5' vs 3'	0.8	No
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	1	Yes	GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	0	No
Runs	< 4 base runs	3	Yes	Runs	< 4 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes	Repeats	< 3 dinuc repeats	3	No
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes	Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		n/a		Worst-case False Priming °C		n/a	

(a) (b)

Gambar 2. Tampilan hasil analisis kualitas desain salah satu sekuens primer dengan menggunakan Clone Manager Professional 9 Demo. Gambar (a) adalah primer dengan kualitas baik dan gambar (b) adalah primer dengan spesifikasi yang tidak memenuhi syarat kualitas primer untuk qRT-PCR

Kandungan GC dan pembentukan struktur dimer merupakan aspek penting saat mendesain primer. Kandungan GC berkontribusi terhadap peningkatan kestabilan primer, karena pasangan basa G dan C membentuk ikatan hidrogen yang kuat, sehingga primer lebih stabil saat menempel pada DNA template (Eling KS et al., 2014). Kadar guanin (G) dan sitosin (C) dalam primer sangat memengaruhi suhu lelehnya (Tm). Primer dengan proporsi GC yang tinggi umumnya memiliki Tm yang lebih tinggi dibandingkan primer yang didominasi oleh adenin (A) dan timin (T). Hal ini karena ikatan antara G dan C lebih kuat dibandingkan ikatan A-T, sehingga memerlukan suhu lebih tinggi untuk memisahkan ikatan tersebut (Rahman et al., 2022). Dengan kata lain, semakin tinggi nilai *GC content* maka sebaiknya mendesain primer dengan *melting temperature* yang lebih tinggi.

Dalam merancang primer untuk PCR, sebaiknya menghindari pembentukan struktur sekunder seperti *hairpin*, *self-dimer*, dan *cross-dimer* karena dapat mengganggu efisiensi serta spesifisitas amplifikasi. Pada desain primer kali ini, tidak ditemukan *self-dimer* dan *cross-dimer* yang dianalisis melalui Primer express (gambar 3).

TGF Beta				TNF Alpha			
Fwd Primer	ATTCTGGCGTTACCTTGG	Tm	%GC	Fwd Primer	TGCTCTGTGAAGGGAATGG	Tm	%GC
		56.2	53			55.7	53
Rev Primer	GTGAGCGCTGAATCGAAAG	Tm	%GC	Rev Primer	TTGGACCTGAGCCATAATC	Tm	%GC
		55.8	53			56.1	50
Hairpin Self Dimers Cross Dimers Most Stable Structure Found 1. Forward and Reverse Cross Dimer 5' ATTCTGGCGTTACCTTGG 3' 3' GTGAGCGCTGAATCGAAAG 5' Hairpins not found Dimers not found				Hairpin Self Dimers Cross Dimers Most Stable Structure Found 1. Forward and Reverse Cross Dimer 5' TGCTCTGTGAAGGGAATGG 3' 3' TTGGACCTGAGCCATAATC 5' Hairpins not found Dimers not found			

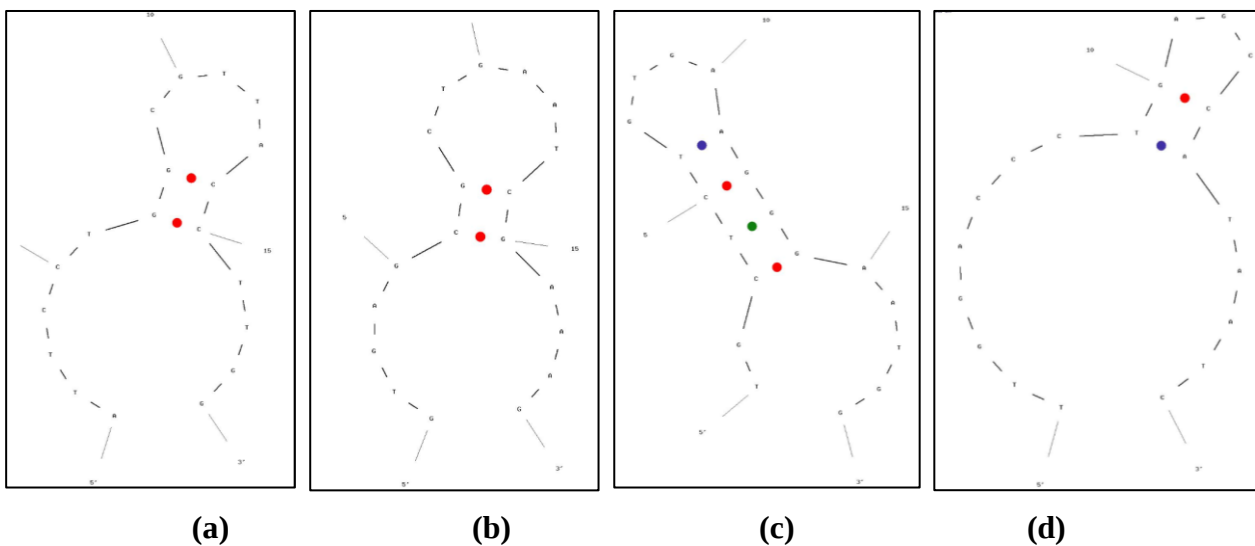
(a) (b)

Gambar 3. Tampilan hasil analisis kualitas kandidat primer dengan menggunakan Primer Express. (a) TGF-β1; dan (b) TNF-α

Hasil analisis sekuens primer dengan Clone Manager Professional 9 Demo (gambar 2) juga menunjukkan bahwa nilai *repeats* dan *runs* berkisar 1-2, artinya kurang dari 3. *Repeats* adalah pengulangan dari dua atau lebih nukleotida secara berulang-ulang dalam primer seperti “TATATATA” sedangkan *runs* adalah pengulangan basa yang sama berturut-turut seperti “AAAAA” (*run of 5 adenine*). Primer yang akhirnya terpilih (tabel 1) tidak memiliki 3 atau lebih basa yang sama secara

berulang karena dapat menurunkan kualitas penempelan primer pada gen target. Primer yang didesain sebaiknya tidak mengandung tiga atau lebih *repeats* dan *runs* karena dapat meningkatkan resiko *false priming* atau kesalahan penempelan primer yang biasanya terjadi di luar suhu *annealing* yang telah ditetapkan. Akibatnya terjadi kesalahan amplifikasi produk tertentu yang bukan target.

Selain itu, yang perlu diperhatikan dalam desain primer adalah *hairpin*. *Hairpin* adalah struktur sekunder yang muncul saat primer melipat dan membentuk ikatan dengan bagian dari sekuensnya sendiri, membentuk struktur melingkar yang tidak diinginkan (Chuang et al., 2013). Oleh karena itu, struktur ini sebaiknya dihindari dalam desain primer karena dapat menghambat *annealing* primer sehingga amplifikasi terganggu (Hutchins et al., 2018). Pada penelitian ini dipastikan bahwa struktur *hairpin* tidak akan mempengaruhi kualitas kandidat primer yang dianalisis melalui website OligoAnalyzer (**Gambar 4**).



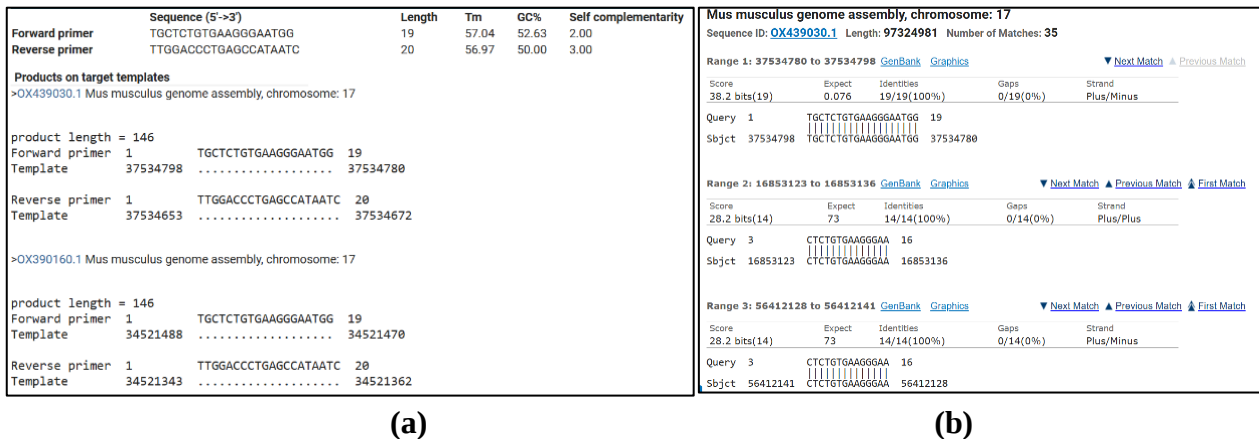
Gambar 4. Struktur sekunder *hairpin* pada kandidat primer (a)TGF- β 1 *Forward*; (b) TGF- β 1 *Reverse* (c) TNF- α *Forward* (d) TNF- α *Reverse*

Stabilitas *hairpin* dinyatakan melalui nilai ΔG , berpotensi memengaruhi efisiensi pemasangan primer dan hasil amplifikasi. Kandidat primer yang dipilih adalah primer dengan nilai ΔG positif yaitu pada rentang 0.8 kcal/mol – 2.9 kcal/mol (**Tabel 1**). Nilai ΔG harus lebih besar dari -3 kcal/mol sedangkan nilai -2 hingga -3 masih dapat ditoleransi (Syamsidi et al., 2021). Apabila nilai ΔG menjauhi angka negatif (positif) dianggap semakin kecil kemungkinan terbentuknya struktur sekunder seperti *hairpin*. Desain primer yang dilakukan tidak memperlihatkan pembentukan struktur *hairpin* yang nilai ΔG lebih kecil dari -3 kcal/mol sehingga dianggap sesuai dan tidak mengganggu proses *annealing* pada reaksi qRT-PCR. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kandidat primer ini dinilai mampu mengenali dan mengagap wilayah target berdasarkan rentang amplifikasi yang telah dirancang melalui analisis *in silico*.

Analisis kespesifikan sekuens primer dengan primer BLAST

Pada penelitian ini dilakukan uji kespesifikan primer dengan gen target yang akan dibandingkan terhadap kumpulan data sekuens multi-organisme melalui website NCBI-Primer BLAST. Spesifitas primer merujuk pada urutan basa yang khusus dan hanya terdapat pada DNA target. Primer berkualitas sebaiknya tidak memiliki kesamaan urutan dengan bagian lain dari genom terutama dari organisme lain,

sehingga meminimalkan ikatan non-spesifik. Untuk menghindari *cross-homology* atau homologi silang sebaiknya dilakukan analisis Primer BLAST-NCBI agar memastikan bahwa primer tidak berikatan dengan sekuens dari organisme lain (Anwar et al., 2022; Dikaya et al., 2023; Ye et al., 2012). Pengujian Primer-BLAST membantu mendeteksi potensi *dimer* pada primer dan *false positive* atau amplifikasi dengan positif palsu sebelum eksperimen secara *in vitro* secara molekuler dimulai (Chen et al., 2021; d'Auriac, 2016). Kandidat primer terpilih dievaluasi spesifisitasnya secara *in silico* menggunakan Primer-BLAST pada basis data genbank NCBI. Hasil Primer-BLAST pada salah satu primer yaitu TNF- α dapat dilihat pada **gambar 5**.



Gambar 5. Hasil analisis kespesifikan salah satu kandidat primer dengan primer-BLAST (a) ukuran produk; (b) presentase kemiripan primer dengan genom target.

Hasil BLAST pada kedua pasang kandidat primer menunjukkan 100% spesifik dengan *Mus musculus* dan juga panjang produk PCR yang telah didesain yakni 137 bp untuk TGF- β dan 146 bp untuk TNF- α . Primer-BLAST bertujuan untuk mengotomatisasi perancangan primer dengan presisi dan melakukan verifikasi apakah kandidat primer yang telah dirancang spesifik terhadap sekuens target dalam database NCBI. Dari keseluruhan parameter dan analisis kualitas dengan menggunakan *software/tools* bioinformatika untuk desain primer, rangkaian hasil analisis menunjukkan bahwa kedua pasang kandidat primer gen TGF- β 1 dan TNF- α tersebut telah memenuhi parameter desain yang optimal untuk aplikasi qRT-PCR dan berpotensi menghasilkan produk amplifikasi yang sesuai dengan lokasi target yang diinginkan. Hal ini menjadikan pasangan primer yang dipilih merupakan kandidat terbaik untuk amplifikasi gen TGF- β 1 dan TNF- α dengan metode qRT-PCR.

KESIMPULAN

Desain primer secara *in silico* untuk mencari kandidat primer gen target terkait inflamasi yaitu TGF- β 1 dan TNF- α dengan metode qRT-PCR telah dilakukan. Penelitian ini menggunakan berbagai *tools/software* bioinformatika dipilih berdasarkan kriteria diantaranya panjang basa, stabilitas primer, ukuran produk PCR, *melting temperature* (Tm), %GC, *hairpin*, *repeats*, *runs*, *false priming*, dan kespesifikasikan primer gen target dengan organisme. Dua pasang kandidat primer yang diperoleh dari hasil desain adalah primer TGF- β 1 forward 5' ATTCCTGGCGTTACCTTGG 3'; reverse 5' GTGAGCGCTGAATCGAAAG 3' dengan produk ampikon 137 bp dan primer TNF- α forward 5' TGCTCTGTGAAGGGAATGG 3'; reverse 5' TTGGACCCTGAGCCATAATC 3' dengan hasil produk 146 bp serta memiliki nilai ΔG lebih besar dari -3 kcal/mol sehingga sangat kecil kemungkinan terjadi *hairpin*. Hasil primer BLAST menunjukkan bahwa desain primer pada kedua gen tersebut

spesifik untuk *Mus musculus*. Desain kandidat primer secara *in silico* merupakan langkah awal yang penting sebelum memulai analisis molekuler secara *in vitro*, namun tetap perlu divalidasi secara eksperimental di laboratorium seperti optimasi suhu annealing (*Ta*), konsentrasi primer dan template yang digunakan melalui mesin qRT-PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang berkontribusi pada keberhasilan penelitian ini, khususnya rekan-rekan di Program Studi Biologi FMIPA Universitas Mulawarman atas saran dan masukan berharga sehingga kami bisa menyelesaikan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, M. A., Nurjanah, S. N., & Rahayu, W. P. (2022). Aplikasi Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) NCBI Pada Penelitian Molekuler Salmonella SPP. *Syntax Literate ; Jurnal Ilmiah Indonesia*, 7(11), 15446. <https://doi.org/10.36418/syntax-literate.v7i11.9037>
- Apriansyah, M. A., Syahrir, M., Rahadiyanto, K. Y., Rosyidi, K. M., & Faisyar, A. (2020). Korelasi Antara Kadar Transforming Growth Factor Beta (TGF- B) Serum Dan Skor Beck Depression Inventory (BDI) Pada Pasien Kanker Kolorektal Di RSMH Palembang. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*, 7(2), 86. <https://doi.org/10.7454/jpdi.v7i2.378>
- Battaglia, G., Cannella, M., Rizzo, B., Orobello, S., Maat-Schieman, M. L. C., Aronica, E., Busceti, C. L., Ciarmiello, A., Alberti, S., Amico, E., Sassone, J., Sipione, S., Bruno, V., Frati, L., Nicoletti, F., & Squitieri, F. (2010). Early Defect of Transforming Growth Factor B1 Formation in Huntington's Disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(3), 555–571. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01011.x>
- Beutler, B. A. (1999). The role of tumor necrosis factor in health and disease. *Journal of Rheumatology*.
- Cai, R., Hao, Y., Liu, Y.-Y., Huang, L., Yao, Y., & Zhou, M.-S. (2020). Tumor Necrosis Factor Alpha Deficiency Improves Endothelial Function and Cardiovascular Injury in Deoxycorticosterone Acetate/Salt-Hypertensive Mice. *BioMed Research International*, 2020(1). <https://doi.org/10.1155/2020/3921074>
- Chauhan, P. S., Lata, C., Tiwari, S., Chauhan, A., Mishra, S. K., Agrawal, L., Chakrabarty, D., & Nautiyal, C. S. (2019). Transcriptional Alterations Reveal Bacillus Amyloliquefaciens-Rice Cooperation Under Salt Stress. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48309-8>
- Chen, Y., Peng, X., Cui, J., Zhang, H., Jiang, J., & Song, Z. (2021). Isolation and Functional Determination of SKOR Potassium Channel in Purple Osier Willow, Salix Purpurea. *International Journal of Genomics*, 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/6669509>
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- d'Auriac, M. A. (2016). COMplementary Primer ASymmetric PCR (COMPAS-PCR) Applied to the Identification of Salmo Salar, Salmo Trutta and Their Hybrids. *Plos One*, 11(10), e0165468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165468>
- Dantas, A. T., Gonçalves, S. M. C., Almeida, A. R. d., Gonçalves, R. S. G., Sampaio, M. C. P. D., Vilar, K. d. M., Pereira, M. C., Rêgo, M. J. B. de M., Pitta, I. d. R., Marques, C. D. L., Duarte, Â. L. B. P., & Pitta, M. G. da R. (2016). Reassessing the Role of the Active TGF- β 1 as a Biomarker in Systemic Sclerosis: Association of Serum Levels With Clinical Manifestations. *Disease Markers*, 2016, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/6064830>
- Debode, F., Marien, A., Janssen, É., Bragard, C., & Berben, G. (2017). The influence of amplicon length on real-time PCR results. *BASE*, 3–11. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.13461>
- Dikaya, V. A., Toropov, V. A., Sukhanitsky, S. V., Ermachenko, E. D., & Lisok, A. V. (2023).

DEVELOPMENT OF A PROGRAM FOR ANALYSIS OF NONSPECIFIC PRIMER AND PROBE ANNEALING ON GENOMES OF ORGANISMS USING NCBI DATABASE AND ALIGNMENTS OBTAINED BY BLAST ALGORITHM. *X Международная Конференция Молодых Ученых: Биоинформатиков, Биотехнологов, Биофизиков, Вирусологов и Молекулярных Биологов — 2023: Сб. Тез.*, 24–25. <https://doi.org/10.25205/978-5-4437-1526-1-15>

- Eling KS, D., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Informatika Medis 2014*, 93–102. <http://snimed.fit.uui.ac.id/>
- Gómez-Bernal, F., Quevedo-Abeledo, J. C., García-González, M., Fernández-Cladera, Y., González-Rivero, A. F., Martín-González, C., González-Gay, M. Á., & Ferraz-Amaro, I. (2023). Transforming Growth Factor Beta 1 Is Associated With Subclinical Carotid Atherosclerosis in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s13075-023-03046-2>
- Hung, J.-H., & Weng, Z. (2016). Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(9), pdb.prot093096. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093096>
- Hutchins, P. R., Sepulveda, A. J., Martin, R. M., & Hopper, L. R. (2018). Improved Conventional PCR Assay for Detecting Tetracapsuloides bryosalmonae DNA in Fish Tissues. *Journal of Aquatic Animal Health*, 30(2), 164–170. <https://doi.org/10.1002/aah.10020>
- Karadeniz, H., Güler, A. A., Özger, H. S., Yıldız, P., Erbaş, G., Bozdayı, G., Bulut, T. D., Gülbahar, Ö., Yapar, D., Küçük, H., Öztürk, M. A., & Tufan, A. (2022). The Prognostic Value of Lung Injury and Fibrosis Markers, KL-6, TGF-β1, FGF-2 in COVID-19 Patients. *Biomarker Insights*, 17. <https://doi.org/10.1177/11772719221135443>
- Muthusami, S., Ramachandran, I. K., Babu, K. N., Krishnamoorthy, S., Guruswamy, A., Queimado, L., Chaudhuri, G., & Ramachandran, I. (2021). Role of Inflammation in the Development of Colorectal Cancer. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 21(1), 77–90. <https://doi.org/10.2174/187153032066200909092908>
- Patel, J. S., & Sarma, B. K. (2018). Designing and Experimental Evaluation of Gene-Specific Primers of Pea (Pisum Sativum) Defense Proteins. *3 Biotech*, 8(11). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1508-4>
- Rahmadona, R., Budiman, B. J., Huriyati, E., Ali, H., & Bachtiar, H. (2023). Perbedaan Ekspresi Transforming Growth Factor Beta 1 Antara Rinosinusitis Kronis Dengan Polip Dan Tanpa Polip. *Jurnal Otorinolaringologi Kepala Dan Leher Indonesia*, 1(1). <https://doi.org/10.25077/jokli.v1i1.23>
- Rahman, M.-M., Lim, S.-J., & Park, Y.-C. (2022). Development of Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Based Triplex PCR Marker for Serotype-specific Escherichia coli Detection. *Pathogens*, 11(2), 115. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020115>
- Rangwala, S. H., Kuznetsov, A., Ananiev, V., Asztalos, A., Borodin, E., Evgeniev, V., Joukov, V., Lotov, V., Pannu, R., Rudnev, D., Shkeda, A., Weitz, E. M., & Schneider, V. A. (2021). Accessing NCBI data using the NCBI Sequence Viewer and Genome Data Viewer (GDV). *Genome Research*, 31(1), 159–169. <https://doi.org/10.1101/gr.266932.120>
- Ruder, B., Atreya, R., & Becker, C. (2019). Tumour Necrosis Factor Alpha in Intestinal Homeostasis and Gut Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1887. <https://doi.org/10.3390/ijms20081887>
- Sunarno, S., Fitri, N., Puspadari, N., & Sariadji, K. (2018). The dtxR Gene: A New Alternative Marker to Identify Corynebacterium ulcerans and Corynebacterium pseudotuberculosis by PCR Assay. *The Indonesian Biomedical Journal*, 10(3), 236–242. <https://doi.org/10.18585/inabj.v10i3.403>
- Syamsidi, A., Aanisah, N., Fiqam, R., & Jultri, I. Al. (2021). Primer Design and Analysis for Detection

- of mecA gene. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 5(3), 245–253. <https://doi.org/10.25026/jtpc.v5i3.297>
- Tonny, T., Kambayana, G., Putra, T. R., & Kurniari, P. K. (2018). Kadar Interleukin-17 (IL-17) Serum Berkorelasi Dengan Rasio Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin (RANKL/OPG) Pada Penderita Sistemik Lupus Eritematosus. *Jurnal Penyakit Dalam Udayana*, 2(1), 1–4. <https://doi.org/10.36216/jpd.v2i1.37>
- Trihono, P. P. (2016). Peran Transforming Growth Factor-B1 Pada Penyakit Ginjal. *Sari Pediatri*, 13(1), 49. <https://doi.org/10.14238/sp13.1.2011.49-54>
- Villanacci, V., Cadei, M., Lanzarotto, F., Ricci, C., Antonelli, E., Cannatelli, R., Gulotta, T., Fontana, L., Pasquali, V., Sigala, S., Salviato, T., Nascimbeni, R., & Bassotti, G. (2019). Localization of TNF alpha in ileocolonic biopsies of patients with inflammatory bowel disease. *Annals of Diagnostic Pathology*, 38, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.10.011>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>