



Volume 10, nomor 2, tahun 2025

Biogenerasi

Jurnal Pendidikan Biologi
<https://e-journal.my.id/biogenerasi>



DESAIN PRIMER GEN *EDNRB* EKSON 6 DAN OPTIMASI PCR UNTUK ANALISIS MUTASI GEN PADA *HIRSCHSPRUNG'S DISEASE*

Divia Yuda Meisya, Universitas Negeri Padang, Indonesia

Yuni Ahda, Universitas Negeri Padang, Indonesia

*Corresponding author E-mail: diviayudameisya@gmail.com

Abstract

Hirschsprung's Disease (HSCR) is a congenital disorder characterized by the absence of ganglion cells in the intestinal wall, leading to impaired intestinal motility. One of the key genes involved in the pathogenesis of HSCR is the *Endothelin Receptor Type B (EDNRB)* gene, particularly mutations in exon 6. Detecting these mutations requires specific primers and well-optimized PCR conditions. This study aims to design specific primers for exon 6 of the *EDNRB* gene using *in silico* methods and to determine optimal PCR conditions through *annealing* temperature and primer concentration optimization. Primers were designed based on the *EDNRB* gene sequence (Accession No. NG_011630.3) using Geneious Prime and validated for specificity using Primer-BLAST. PCR optimization was conducted *in vitro* using various *annealing* temperatures 52.8–55.3°C and primer concentrations 0.5–1.1 µM on normal human DNA samples. PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. The primer design for exon 6 of the *EDNRB* gene yielded the following results: both *forward* and *reverse* primers were 20 bp in length, with melting temperatures (T_m) of 58.1°C and 56.1°C, and GC contents of 55% and 50%, respectively. *In silico* analysis confirmed primer specificity to chromosome 13. Optimal PCR conditions were achieved at an *annealing* temperature of 55.3°C and a primer concentration of 0.7 µM, yielding a single amplicon of 517 bp.

Keywords: *Hirschsprung's Disease*, *EDNRB*, exon 6, primer design, PCR optimization, *in silico*.

Abstrak

Hirschsprung's Disease (HSCR) adalah kelainan kongenital yang disebabkan oleh tidak adanya sel ganglion pada dinding usus, yang mengakibatkan gangguan motilitas usus. Salah satu gen yang berperan penting dalam patogenesis HSCR adalah *Endothelin Receptor Type B (EDNRB)*, terutama mutasi pada ekson 6. Deteksi mutasi memerlukan primer yang spesifik dan PCR yang teroptimasi dengan baik. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer spesifik untuk ekson 6 gen *EDNRB* secara *in silico* dan menentukan kondisi optimum PCR melalui optimasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer. Primer didesain berdasarkan sekuen gen *EDNRB* (Accession No. NG_011630.3) menggunakan *Geneious Prime*, kemudian diuji spesifisitasnya dengan Primer-BLAST. Optimasi PCR dilakukan secara *in vitro* dengan variasi suhu *annealing* 52,8–55,3°C dan konsentrasi primer 0,5–1,1 µM, menggunakan sampel darah manusia normal. Produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5%. Dari proses desain primer pada ekson 6 gen *EDNRB* didapatkan hasil sebagai berikut. Panjang primer *forward* dan *reverse* adalah 20 bp dengan T_m masing-masing 58,1°C dan 56,1°C serta %GC 55% dan 50%. Uji *in silico* menunjukkan spesifisitas terhadap kromosom 13. Kondisi optimum PCR dicapai pada suhu *annealing* 55,3°C dan konsentrasi primer 0,7 µM, menghasilkan amplicon tunggal sepanjang 517 bp.

Kata Kunci: *Hirschsprung's Disease*, *EDNRB*, ekson 6, desain primer, optimasi PCR, *in silico*.

© 2025 Universitas Cokroaminoto palopo

Correspondence Author :
Universitas Negeri Padang

p-ISSN 2573-5163
e-ISSN 2579-7085

PENDAHULUAN

Penyakit *Hirschsprung* merupakan penyakit bawaan (cacat lahir) pada usus yang disebabkan oleh kurangnya sel ganglion (saraf) pada dinding usus. Penyakit ini sering disebut aganglionosis atau megakolon (*ganglionic megacolon*). Gangguan ini menghambat pergerakan normal usus, yang berakibat pada akumulasi tinja di bagian usus yang terkena, menyebabkan gejala seperti sembelit, kembung, muntah, dan perut buncit (Lotfollahzadeh *et al.*, 2023). Mayoritas penyakit *Hirschsprung* di Indonesia terjadi pada bayi yang cukup bulan dan berat lahirnya rendah atau berat badan kurang dari 3 kg, lebih umum pada laki-laki daripada perempuan (Mulyaningrum, 2024).

Penyakit *Hirschsprung* dipengaruhi oleh sejumlah gen, kurang lebih terdapat 20 gen yang telah diidentifikasi terkait dengan *Hirschsprung* yaitu *Rearranged During Transfection* (RET), *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF), *Family Receptor Alpha 1* (GFR α 1), *Neurturin* (NRTN), *Endothelin Receptor Type B* (EDNRB), *Endothelin 3* (ET3), *Zinc Finger Homeobox 1B* (ZFHX1B) atau *ZEB2*, *Paired-like Homeobox 2b* (PHOX2B), *SRY-box 10* (SOX10), *Indian Hedgehog* (IHH), dan *Sonic Hedgehog* (SHH). Gen-gen ini berfungsi mengkode protein seperti faktor transkripsi, ligan, dan reseptor yang berperan penting dalam proses perkembangan penyakit (Diposarosa *et al.*, 2021).

EDNRB (*endothelin-B receptor gene*) terletak di kromosom 13q22, terdiri dari 7 exon dan 6 intron. Gen *EDNRB* berperan dalam perkembangan sel-sel saraf pada usus besar. Mutasi pada gen ini lebih sering ditemukan pada kasus *Hirschsprung* non-keturunan dan tipe segmen pendek (Wijayana, 2023). Reseptor Endothelin B (*EDNRB*) adalah gen kedua yang paling sering bermutasi setelah *RET* pada penyakit *Hirschsprung* (Widowati *et al.*, 2016). Mutasi dapat berupa mutasi *nonsense*, mutasi *missense*, *delesi* dan *insersi* (Bradnock *et al.*, 2017).

Mutasi dapat dilacak dengan teknik sequencing yang didahului dengan amplifikasi segmen DNA target dengan teknik PCR (Grada & Weinbrecht, 2013). Terdapat beberapa komponen yang dibutuhkan untuk PCR, salah satunya adalah primer (Putri, 2019). Primer yang baik akan dapat

mengamplifikasi DNA target secara spesifik. Primer yang baik memiliki rentang Tm antara 59,1 - 60°C, tidak memiliki perbedaan Tm antara primer *forward* dan *reverse*, namun perbedaan Tm masih dapat ditolerir sampai 5°C. Perbedaan Tm yang terlalu besar dapat mengganggu proses amplifikasi. Primer yang baik juga memiliki panjang nukleotida 18-22 bp (Badriyya & Achyar, 2022), tidak memiliki *none dimers* dan *hairpins* dan persentase basa GC masing-masing sekuens yaitu 45-55% (Sihotang *et al.*, 2021).

Untuk mendapatkan hasil pita PCR yang optimal, diperlukan optimasi suhu *annealing* pada primer yang digunakan. *Annealing* adalah tahap ketika primer menempel pada DNA target. Rentang umum suhu *annealing* untuk PCR standar adalah 50–65°C. Pada penelitian ini akan dilakukan desain primer untuk ekson 6 secara *in silico* dan optimasi PCR secara *in vitro* menggunakan sampel darah manusia normal.

METODE

Penelitian dilakukan pada Maret – April 2025 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Jenis penelitian ini adalah deskriptif. Tujuan penelitian deskriptif adalah untuk memberi gambaran atau deskripsi mengenai desain primer gen *EDNRB* ekson 6 dan optimasi PCR.

Alat yang digunakan *autoclave* (Tomy Japan), komputer dan *software* bioinformatik, *thermal cycler* (SensoQuest), tabung PCR (ExtraGene), mikropipet (COMECTA), *vortex* (LSE vortex mixer), *Spin down* (Bio Rad), *Tube's plate*, *ice box*, mesin elektroforesis (*Thermofisher*), *Microwave* (Sharp), *plastic frame*, sisir sumur dan mikropipet (COMECTA), *Gel Documentation* (Uvitec).

Bahan adalah sampel darah manusia normal, *cell lysis solution*, *nucleic lysis solution*, *protein precipitation solution*, *DNA rehydration solution*, *RNase A solution*, Tris-HCl, *Natrium Hidroksida* (NaOH), *Ethylene Diamine Tetra-Acetic Acid* (EDTA), *Ultra Pure Distilled Water* (ddH₂O), aluminium foil, etanol absolut, tips steril, alkohol 70%, *buffer* TE PH 8, *buffer* TAE 50x, *nuclease-free water* (NFW), GoTaq Green Master MIX, primer *forward* dan primer *reverse*, *buffer* TAE 1x, DNA ladder 100 bp, *loading dye*, GelRed. Prosedur Penelitian

Pelaksanaan Penelitian

a. Desain Primer gen *EDNRB*

Primer didesain menggunakan aplikasi *Geneious Prime*. Sekuen gen *EDNRB* (*Accession number*: NG_011630.3) diunduh pada situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format *GenBank*. 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. Uji spesifisitas menggunakan Primer-BLAST karena memiliki tingkat deteksi yang tinggi (Ye *et al.*, 2012).

b. Optimasi Suhu *Annealing* dengan Gradient PCR

Optimasi suhu *annealing* menggunakan gradien PCR dengan komponen mix PCR terdiri dari GoTaq Green Master 5 µL, primer *EDNRB forward* dan *reverse* 1 µM, Nuclease-Free water 2 µL, dan DNA template 1 µL. Setelah itu, program PCR dibagi menjadi tiga tahap: tahap denaturasi awal, yang berlangsung selama lima menit pada suhu 95°C; tahap pengulangan siklus, yang berulang sebanyak 35 kali dan terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik; tahap *annealing*, yang berlangsung selama 30 detik pada gradien suhu 52.8°C, 53.3°C, 54.0°C, 54.7°C dan 55.3°C; dan tahap suhu elongasi, yang berlangsung selama lima menit pada suhu 72°C.

c. Optimasi Konsentrasi Primer

Konsentrasi reaksi PCR untuk optimasi konsentrasi primer sama dengan optimasi suhu *annealing*. Primer dibuat dengan beberapa konsentrasi yaitu konsentrasi 0,5-1,1 µM.

d. Elektroforesis

Produk PCR divisualisasikan menggunakan gel agarose 1,5% yang dibuat dengan

melarutkan 1,5 gram agarose dalam 100 mL larutan TAE 1X, lalu dipanaskan selama 20 detik hingga larut. Setelah didinginkan sebentar, larutan dituangkan ke cetakan dan dibiarkan mengeras. Gel kemudian dipindahkan ke alat elektroforesis berisi larutan TAE hingga seluruh permukaan gel terendam. Ke dalam sumur gel ditambahkan: 15 µL GelRed, 3 µL DNA *ladder* 100 bp, dan 2 µL *loading dye*. Untuk sampel, dicampur 5 µL GelRed dan 5 µL sampel darah (tanpa *loading dye* karena sudah mengandung GoTaq Green Master Mix dari tahap PCR). Elektroforesis dijalankan selama 35 menit pada 100 volt, dan hasilnya divisualisasikan menggunakan UVITEC.

e. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh pada hasil penelitian dibahas secara kualitatif. Data yang dianalisis adalah hasil desain primer, hasil optimasi suhu *annealing* dan optimasi konsentrasi primer yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

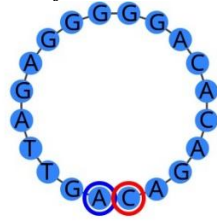
1. Desain Primer Ekson 6 Gen *EDNRB* dan Uji Spesifisitas secara *In silico*

Pada penelitian ini dilakukan desain primer secara *in silico* menggunakan program *Geneious Prime* pada sekuen gen *EDNRB* (*Accession number*: NG_011630.3). Proses desain primer menghasilkan 2 pasang kandidat primer (Lampiran 2). Dari 2 pasang kandidat primer yang ada, dipilih kandidat pasangan primer 1 karena memenuhi kriteria primer yang baik. Tabel 4 menunjukkan karakteristik primer yang dipilih menggunakan program *Geneious Prime*. Parameter yang dianalisis meliputi panjang basa, produk PCR, *melting temperature* (*T_m*), %GC, *hairpin* dan *self-dimer*.

Tabel 1. Karakteristik Hasil Desain Primer pada Ekson 6

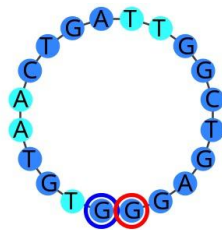
Sequence (5'→3')	Karakteristik					
	%GC	TM (°C)	Hair pin	Self dimer	Panjang basa (nt)	Produk PCR (bp)
Kandidat primer 1 <i>Forward</i> AGTTAGAGGGGACACAGAC	55.0	58.1	None	None	20	517 bp

DNA fold



Reverse	50.0	56.1	None	None	20
GTGTAAGTGAATTGGCTGAGG					

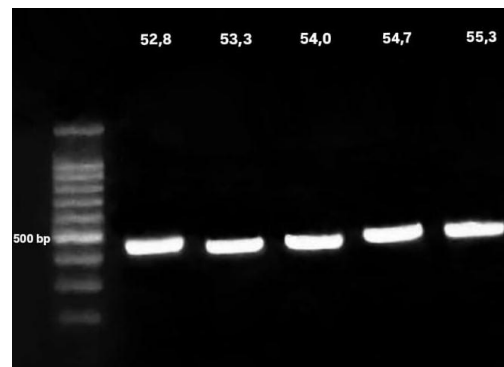
DNA fold



2. Optimasi Kondisi PCR

a. Optimasi Suhu *Annealing* dengan *Gradient* PCR

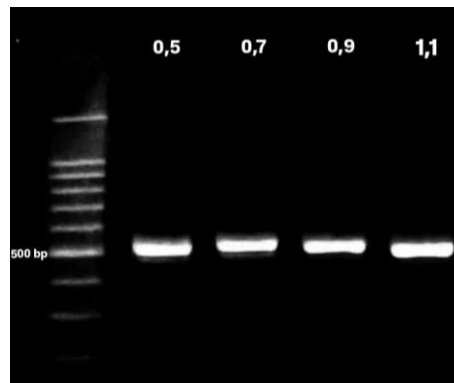
Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk memperoleh suhu yang optimum agar primer menempel pada DNA cetakan saat melakukan PCR. Untuk memperoleh suhu yang optimum dilakukan gradient PCR dengan menggunakan suhu yang bervariasi. Variasi suhu *annealing* yang digunakan berada pada suhu 52.8°C, 53.3°C, 54.0°C, 54.7°C dan 55.3°C. Hasil elektroforesis menunjukkan suhu 55.3°C adalah suhu yang tepat ditandai dengan pita tunggal dan terlihat paling tebal dan terang dengan ukuran amplikon yang sesuai yaitu 517 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Elektroforesis *Gradient* PCR *Ladder* 100bp, suhu 52.8°C, 53.3°C, 54.0°C, 54.7°C dan 55.3°C

b. Optimasi Konsentrasi Primer

Variasi konsentrasi primer yang digunakan adalah 0,5 μ M, 0,7 μ M, 0,9 μ M dan 1,1 μ M. Penggunaan beberapa primer dengan konsentrasi berbeda untuk amplifikasi gen *EDNRB* ekson 6 menghasilkan produk PCR dengan ketebalan yang hampir sama. Berdasarkan hasil ini, keempat konsentrasi dapat digunakan dalam reaksi PCR, namun untuk efisiensi bisa digunakan konsentrasi 0,7 μ M.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis Optimasi Konsentrasi Primer. *Ladder* 100bp, konsentrasi 0,5 μM , 0,7 μM , 0,9 μM , 1,1 μM

Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan desain primer gen *EDNRB* (*Accession number*: NG_011630.3) ekson 6 secara *in silico* menggunakan program *Geneious Prime*. Hasil penelitian ini diperoleh pasangan primer *forward* 5'-AGTTAGAGGGGGACACAGAC-3' dan *reverse* 5'-GTGTAAGTATTGGCTGAGG-3'. Aspek yang dianalisis saat mengamplifikasi primer antara lain panjang basa, *melting temperatur* (T_m), %GC, *hairpin* dan *self dimer*. Panjang basa 18-30 basa merupakan panjang primer yang ideal (Achyar *et al.*, 2021). Karakteristik hasil desain primer (Tabel 4) memiliki panjang basa pada primer *forward* 20 basa dan primer *reverse* juga memiliki panjang 20 basa.

Salah satu faktor paling penting dalam mendesain primer adalah persentase GC. Menurut Saraswati & Dwi Wahyuni, (2019) persentase kandungan GC yang ideal berkisar antara 40-60%. Primer dengan persentase GC rendah diperkirakan tidak dapat bersaing secara efektif untuk menempel pada target yang diinginkan, yang kemungkinan akan mengurangi efisiensi proses PCR. Sementara, persentase GC yang tinggi akan meningkatkan T_m serta suhu *annealing* PCR (Sari, 2018). Karakteristik hasil desain primer (Tabel 4) memiliki %GC yang sesuai yaitu berkisar 50.0-55.0%.

Melting temperatur (T_m) juga termasuk faktor penting yang mempengaruhi keberhasilan proses PCR, karena menentukan suhu *annealing* optimal di mana primer dapat menempel secara spesifik pada template DNA. Umumnya, nilai T_m yang ideal untuk primer berada dalam rentang 50 hingga 62°C. Perbedaan suhu T_m antara primer *forward* dan

reverse sebaiknya tidak lebih dari 5°C, karena perbedaan yang terlalu besar dapat mengganggu efisiensi penempelan primer dan menyebabkan gagalnya amplifikasi DNA (Nugraha *et al.*, 2022). Didapat hasil desain primer T_m *forward* 58,1°C dan T_m *reverse* 56,1°C (Tabel 4) dengan selisih T_m 2°C yang masih berada dalam batas toleransi ideal dan mendukung terjadinya amplifikasi yang optimal.

Dalam proses mendesain primer, penting untuk menghindari terbentuknya struktur seperti *hairpin* dan *self dimer*. *Hairpin* merupakan primer yang menempel pada dirinya sendiri sehingga membentuk struktur sekunder, sedangkan *self dimer* terjadi bila terbentuk ikatan pada dua primer sejenis (primer *forward* dengan primer *forward* atau primer *reverse* dengan primer *reverse*) (Aulia *et al.*, 2023). Karakteristik hasil desain primer (Tabel 4) tidak memiliki (*none*) *hairpin* dan *self dimer*.

Melting temperature (T_m) dari primer menjadi acuan utama dalam menentukan suhu *annealing* (T_a). Jika T_a terlalu tinggi, primer yang telah menempel pada DNA cetakan bisa terlepas, sehingga produk PCR tidak terbentuk. Sebaliknya, jika T_a terlalu rendah, primer bisa menempel secara tidak spesifik pada DNA, yang dapat menghasilkan produk yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, menentukan suhu *annealing* yang tepat berdasarkan nilai T_m primer sangat penting (Aulia *et al.*, 2021). Suhu *annealing* ditentukan oleh primer yang digunakan, sebaiknya suhu yang digunakan sekitar 5°C di bawah suhu leleh (Aris *et al.*, 2013).

Hasil gradient PCR divisualisasikan dengan elektroforesis menggunakan agarose 1,5% dan dijalankan selama 35 menit. Variasi

suhu *annealing* yang digunakan berada pada suhu 52.8°C, 53.3°C, 54.0°C, 54.7°C dan 55.3°C, diperoleh suhu *annealing* yang optimal yaitu 55.3°C. Hasil elektroforesis (Gambar 4) menunjukkan pita DNA yang paling tebal dan terang berada pada suhu 55,3°C dengan ukuran ampikon yang sesuai (517 bp). Pita DNA yang tebal dan tunggal/mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam tube, disentrifus atau bahkan karena temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu (Setyawati *et al.*, 2021).

Untuk menentukan konsentrasi primer yang optimal, dilakukan uji optimasi dengan variasi konsentrasi sebesar 0,5 µM, 0,7 µM, 0,9 µM, dan 1,1 µM. Berdasarkan Gambar 4, konsentrasi 0,7 µM menghasilkan pita yang paling jelas, tebal, dan sesuai dengan ukuran target yang diharapkan. Konsentrasi primer yang kurang mencukupi atau berlebihan dapat menghambat proses amplifikasi dan menghasilkan primer dimer (pita yang terbentuk oleh primer yang saling berinteraksi dan bukan oleh target spesifik), menyebabkan gangguan dalam hasil PCR (Mardiana *et al.*, 2023).

SIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini telah berhasil mendesain primer spesifik untuk ekson 6 gen *EDNRB*, dengan sekuens primer *forward* yaitu 5'-AGTTAGAGGGGACACAGAC-3' dan primer *reverse* 5'-GTGTAAGTATTGGCTGAGG-3' yang menghasilkan ampikon sepanjang 517bp. Kondisi optimum PCR dengan suhu *annealing* 55,3°C dan konsentrasi primer yang optimum adalah 0,7 µM.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk penelitian selanjutnya melihat mutasi yang terjadi pada sampel pasien *Hirschsprung's Disease* dengan metode metode PCR-sequencing.

DAFTAR RUJUKAN

- 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.
- Aris, M., Sukenda, S., Harris, E., & Sukadi, M. F. (2013). Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design. *E-Journal Budidaya Perairan*, 1(3).
- Aulia, S. L., Suwignyo, R. A., & Hasmeda, M. (2021). Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 18(1), 44-54.
- Azalia, S. N., & Ahda, Y. (2024). Literature review: The role of RET gene mutations in the emergence of Hirschsprung disease. *Jurnal Biologi Tropis*, 24(2), 37-43.
- Badriyya, E., Achyar, A., & Syamsurizal. (2022). Primer Design of SNP rs4506565 Transcription Factor 7 like 2 (TCF7L2) Gene to Detect Type-2 Diabetes Mellitus. *Proceedings of the 2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy 2021 (ICCSCP 2021)*, 40(Iccscp), 1–6.
- Bradnock, T. J., Knight, M., Kenny, S., Nair, M., & Walker, G. M. (2017). Hirschsprung's disease in the UK and Ireland: incidence and anomalies. *Archives of disease in childhood*, 102(8), 722-727.
- Chatterjee, S., & Chakravarti, A. (2019). A gene regulatory network explains *RET-EDNRB* epistasis in *Hirschsprung* disease. *Human Molecular Genetics*, 28(18), 3137-3147.
- Diposarosa, R., Bustam, N. A., Sahiratmadja, E., Susanto, P. S., & Sribudiani, Y. (2021). Literature review: enteric nervous system development, genetic and epigenetic regulation in the etiology of *Hirschsprung's* disease. *Heliyon*, 7(6).

- Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of investigative dermatology*, 133(8), e11.
- Listiani, L., Dhanti, K. R., Kurniawan, K., & Widodo, O. S. Y. (2023). Optimasi Suhu *Annealing* Gen *Blaz* Dari Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) Pada Peralatan Medis: Optimization *Annealing* Temperature Gene *blaZ* of Bacterial *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) in Medical Equipment. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*, 6(1), 420-425.
- Lotfollahzadeh, S., Taherian, M., & Anand, S. (2023). *Hirschsprung* disease. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Mardiana, A., Dhanti, K. R., Kurniawan, K., & Sulistyowati, R. (2023). Optimasi Konsentrasi Primer Dan Suhu *Annealing* Dalam Mendeteksi Gen *Blaz* Pada Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* Di Udara: Optimization of Primary Concentration and *Annealing* Temperature in Detecting *Blaz* Gene in Airborne *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Bacteria. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*, 6(1), 389-393.
- Mulyaningrum, F. M. (2024). Faktor Faktor Yang Mempengaruhi Terjadinya Penyakit *Hirschsprung* Pada Anak Di RSUD RA Kartini Jepara. *Hikmah Journal of Health*, 2(2), 6-11.
- Nugraha, R., Dewi, P. S., & Nurilmala, M. (2022). Evaluasi Primer Gen COI sebagai Biomarker Ketertelusuran Ikan menggunakan Bioinformatika. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(1), 67-79.
- Pane, E. R., Legasari, L., & Mardini, I. (2024). Penggunaan Primer Gen Cytochrome Oxidase 1 Dalam Reaksi Polymerase Chai Reaction (Pcr) Untuk Identifikasi Kandungan Babi Pada Makanan. *Jurnal Crystal: Publikasi Penelitian Kimia dan Terapannya*, 6(2), 95-102.
- Park, J. S., Pisanic, T., Zhang, Y., & Wang, T. H. (2021). Ligation-enabled fluorescence-coding PCR for high-dimensional fluorescence-based nucleic acid detection. *Analytical chemistry*, 93(4), 2351-2358.
- Putri, D. H. (2019). Analisis Internal Primer Of Genes 16s Rna Endophytic Bacteria Producing Compound Antimicrobial For Sequencing. *Serambi Biologi*, 4.
- Putri, R. S. (2024). Analisis Mutasi Pada Ekson Intron 6 dan 10 Gen *RET* dari Pasien *Hirschsprung* Disease di RSUP Dr. M. Djamil Padang (Skripsi, Universitas Negeri Padang).
- Saraswati, H., & Dwi Wahyuni, F. (2019). Desain Primer Secara *In silico* untuk Amplifikasi Gen *cryIII* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33-38.
- Setiaputri, A. A., Rohmad Barokah, G., Alsere Bardian Sahaba, M., Dini Arbajayanti, R., Fabella, N., Mustika Pertiwi, R., Nurilmala, M., Nugraha, R., & Abdullah, A. (2020). Perbandingan Metode Isolasi DNA pada Produk Perikanan Segar dan Olahan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), 447-458.
- Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi konsentrasi primer dan suhu *annealing* dalam mendeteksi gen leptin pada sapi peranakan ongole (PO) menggunakan polymerase chain reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(1), 36-40.
- Sihotang, M. A., Erwinda, Y. E., Suwarni, E., & Lusianti, E. (2021). Desain Primer dan Analisis *in silico* untuk Amplifikasi Gen *mt-Co1* pada Tikus got (*Rattus norvegicus*). *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 1(2), 20-29.
- Silambi, A., Setyawati, T., & Langitan, A. (2020). Case report: *Hirschsprung* disease. *Jurnal Medical Profession (MedPro)*, 2(1), 36-40.
- Suryandari, A. E. (2017). Analisis Faktor

- Yang Mempengaruhi *Hirschsprung* Di Rumah Sakit Prof. Dr. Margono Soekarjo Purwokerto. *Bidan Prada*.
- Widowati, T., Melhem, S., Patria, S. Y., De Graaf, B. M., Sinke, R. J., Viel, 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.
- Wijayana, K. A. (2023). Penyakit *Hirschsprung*: Sebuah Tinjauan Pustaka Tentang Patofisiologi, Diagnosa, Dan Terapi. *Mandala Of Health*, 16(2), 134-145.
- 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(134).
- Zheng, Y., Lan, C., Wang, N., Xu, X., Hu, T., Wu, Q., ... & Li, C. (2020). Significant Association of rs2147555 Genetic Polymorphism in the *EDNRB* Gene with *Hirschsprung* Disease in Southern Chinese Children. *BioMed Research International*, 2020(1), 5956412.