

Short Communication: Desain Primer dan Analisis in Silico untuk Amplifikasi Gen mt-Co1 pada Tikus got (*Rattus norvegicus*)

Maria A E D Sihotang^{a,1,*}, Yola Eka Erwinda^{a,2}, Eniek Suwarni^{a,3}, Erita Lusianti^{a,4}

^a Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan POM, Jl. Percetakan Negara 23, Jakarta, 10440

¹maria.arieni@pom.go.id; ²yolaeka.erwinda@pom.go.id*; ³eniek.suwarni@pom.go.id, ⁴erita.lusianti@pom.go.id

* corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Article history

Received: 17
September 2021

Revised: 27
Oktober 2021

Accepted: 8
November 2021

DOI:

<https://doi.org/10.54384/eruditio.v1i2.82>

Daging tikus got (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu bahan yang kadang-kadang digunakan untuk campuran bakso sapi dan pangan olahan lain untuk menekan harga produksi. Hal ini sangat merugikan konsumen, baik dari segi kesehatan maupun kehalalan produk pangan. Untuk mencegah terjadinya hal tersebut, pengembangan metode uji untuk mendeteksi daging tikus got dalam pangan olahan sangat diperlukan. Salah satu metode yang mudah dan cepat dalam mengidentifikasi daging tikus got dalam pangan olahan adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pengembangan metode *endpoint* PCR telah dilakukan, namun metode tersebut masih memiliki beberapa kekurangan dari segi spesifisitas dan kecepatan dalam perolehan hasil. pengembangan metode deteksi daging tikus got dengan metode *real-time* PCR perlu dikombinasikan dengan *TaqMan probe* yang lebih sensitif dan spesifik, sehingga dapat menjadi alternatif untuk pendeteksian daging tikus got dalam pangan olahan. Desain primer dan *probe* merupakan langkah awal dalam pengembangan metode deteksi dengan *real-time* PCR. Penelitian ini bertujuan mendesain primer dan *probe* untuk deteksi gen *mt-Co1* pada tikus got lalu dianalisis *in silico*. Sekuens *gen mt-Co1 Rattus norvegicus* (NC_001665.2) diperoleh dari pangkalan data National Center of Biotechnology Information (NCBI). Primer didesain menggunakan perangkat lunak Primer3Plus. Selanjutnya, beberapa kandidat primer dan *probe* dianalisis spesifisitasnya terhadap gen *mt-Col* secara *in silico* menggunakan beberapa perangkat lunak, antara lain Primer-BLAST dan Nucleotide-BLAST. Primer dan *probe* yang spesifik terhadap gen *mt-Col* pada tikus got (*Rattus norvegicus*) berhasil didesain dengan sekuens primer *forward* 5'-ATGAGCAAAAGCCCACTTG-3'; sekuens primer *reverse* 5'-CGGCCGTAAGTGAGATGAAT-3'; dan *probe* 5'-GCAGGGATACCTCGTCGTTA-3'. Primer dan *probe* ini dapat dimanfaatkan untuk pengembangan metode deteksi daging tikus pada bakso atau pangan olahan lain menggunakan *real-time* PCR dan *TaqMan probe*.

Brown rat or commonly called sewer rat (Rattus norvegicus) meat is one of ingredients that is usually used to counterfeit beef meatballs to reduce the production prices. These issues can be very detrimental to consumers, in terms of health and halal reasons. Thus, this condition has prompted the development of test methods to detect sewer rat meat in processed foods. Several method developments in detecting the content of sewer rat meat in processed food have been carried out. One of the simplest and fastest methods to identify sewer rat meat is Polymerase Chain Reaction (PCR). Most method developments for detecting sewer rat meat have used endpoint PCR, but this method still has several shortcomings in terms of specificity and promptness in obtaining results. Therefore, developing a sewer rat meat detection method using real-time PCR and combined with a more sensitive and specific TaqMan probe can be an alternative for detecting sewer rat meat in processed foods. Primer and probe design is the first and crucial step in the development of detection methods with real-time PCR. This study aims to design primers and probes for the detection of the mt-Col gene in sewer rats. The mt-Col gene sequence of Rattus norvegicus (NC_001665.2) was obtained from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database. Primer was designed using Primer3Plus software. Then, several candidates of primers and probes were analyzed in silico for specificity of the mt-Col gene using

software, including Primer-BLAST and Nucleotide-BLAST. The result of this study is primers and probes which are specific to the mt-Co1 gene in sewer rats (*Rattus norvegicus*), with the sequence of forward primer (5'-ATGAGCAAAGCCC ACTTTG-3'), reverse primer (5'-CGGCCGTAAGTGAGATGAAT-3'), and probe (5'-GCAGGGATACCTCGTCGTTA-3'). The result can be used to develop methods for detecting sewer rat meat in meatballs or other processed foods using real-time PCR and TaqMan probes.

Keywords: real-time PCR, in silico, primer, *Rattus norvegicus*, mt-Co1
Kata Kunci: real-time PCR, in silico, primer, *Rattus norvegicus*, mt-Co1

1. Pendahuluan

Pemalsuan daging pada pangan olahan menggunakan beberapa hewan, seperti daging tikus, babi, anjing, kucing, atau monyet menimbulkan kerugian dan keresahan bagi masyarakat ditinjau dari sisi kesehatan (Ali et al., 2015). Tikus dapat menyebabkan penyakit bagi manusia, seperti leptosperosis, salmonellosis, demam lassa dan *lymphocytic chorio-meningitis* (Centers for Disease Control and Prevention, 2017). Banyak virus dapat ditemukan tidak hanya di saliva, badan, dan darah, tapi juga terdapat pada rambut dan feses (Akimkin et al., 2016). Salah satu patogen yang disebarkan oleh tikus dan dapat menyebabkan penyakit serius pada manusia adalah *plaque*, yang disebabkan oleh bakteri *Yersinia pestis* (Bobrov et al., 2015). Dikarenakan daging tikus memiliki protein tinggi dan harganya yang cenderung murah, maka daging tikus biasanya dijadikan sebagai campuran pangan olahan (Chen et al, 2020). Daging tikus got (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu bahan yang kadang-kadang digunakan untuk campuran makanan. Kondisi tersebut mendorong pengembangan metode uji untuk deteksi daging tikus got di dalam pangan olahan untuk melindungi produsen dan konsumen.

Beberapa metode untuk mendeteksi tikus dalam pangan olahan telah dikembangkan. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah salah satu metode yang pernah dikembangkan untuk mendeteksi daging tikus dalam pangan olahan. Prinsip pengujian ini adalah dengan pemisahan peptide dalam pangan olahan lalu dibandingkan dengan profil peptida pada daging tikus, daging babi, dan daging sapi (Roswiem & Septiani, 2018). Namun demikian, metode tersebut sepertinya kurang sensitif karena profil pemisahan peptida antara daging sapi, daging babi, dan daging tikus tidak terlalu berbeda. Selain itu metode ini dipengaruhi oleh formulasi *stacking gel* dan *running gel* yang digunakan pada SDS-PAGE, tetapi belum ada standar formulasinya. Metode alternatif lain yang paling sering digunakan dalam deteksi tikus adalah pengujian berbasis DNA yang menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode yang dapat digunakan dalam pengujian rutin untuk mengidentifikasi jenis spesifik, karena mudah, cepat dan memungkinkan untuk mendeteksi beberapa jenis pada saat yang sama (Rodrigues et al., 2017). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mendeteksi tikus menggunakan metode PCR. Namun, penelitian-penelitian tersebut masih menggunakan metode *endpoint* PCR (Nuraini et al., 2012; Ahamad et al., 2017; Cahyadi et al., 2020). Metode tersebut membutuhkan tahapan tambahan berupa visualisasi hasil amplifikasi setelah proses PCR selesai, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk deteksi relatif lebih lama. Selain itu, hasil amplifikasi DNA menggunakan *endpoint* PCR cenderung kurang sensitif untuk mendeteksi DNA target dengan konsentrasi rendah (VanGuilder et al., 2008; Purcell et al., 2016). Oleh karena itu, metode yang dapat mendeteksi tikus got dalam pangan olahan dengan lebih spesifik dan cepat sangat dibutuhkan.

Identifikasi jenis menggunakan *TaqMan probe* spesifik dengan metode *real-time* PCR dapat meningkatkan spesifisitas dan kecepatan pengujian. Penggunaan metode ini memungkinkan pengamatan hasil pengujian dilakukan pada saat proses perbanyakan DNA sedang berlangsung (VanGuilder et al., 2008). Metode ini didasarkan pada hibridisasi spesifik dari *probe* yang dirancang untuk jenis tertentu dengan DNA dalam sampel yang akan dianalisis. Hibridisasi hanya akan terjadi pada DNA yang merupakan komplemen dari *probe* spesifik (Herrero et al., 2010). Penggunaan *Taqman probe* pada *real-time* PCR dapat meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas deteksi (Su et

al., 2013). Dengan pertimbangan tersebut, dibutuhkan pengembangan metode deteksi daging tikus got dalam pangan olahan menggunakan *real-time* PCR dan *TaqMan probe*.

Salah satu gen yang dapat digunakan untuk mendeteksi tikus adalah gen *Cytochrome C Oxidase Subunit I (mt-CoI)* (Tobe et al., 2009). Gen *mt-CoI* terdapat di mitokondria dan telah digunakan secara luas untuk studi genetika populasi, filogeni, spesiasi dan sistematika (Geller et al., 2013). Desain primer yang spesifik sangat menentukan keberhasilan metode PCR (Suparman, 2016). Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan desain primer dan *probe* untuk mendeteksi gen *mt-CoI* pada tikus (*Rattus norvegicus*). Selanjutnya primer dan *probe* tersebut akan dianalisis secara *in silico* untuk mendapatkan primer yang spesifik.

2. Metodologi

2.1 Gen *mt-CoI Rattus norvegicus*

Sekuens gen *mt-CoI Rattus norvegicus* (NC_001665.2) diperoleh dari National Center of Biotechnology Information (NCBI) pada situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Pada kotak menu yang tersedia, dipilih kategori *gene*. Selanjutnya pada kotak teks diketik *CoI Rattus norvegicus* untuk memulai pencarian. Sekuens gen *mt-CoI Rattus norvegicus* yang diperoleh selanjutnya diubah menjadi format FASTA.

2.2 Desain Primer

Format FASTA gen *mt-CoI Rattus norvegicus* yang diperoleh diolah dengan perangkat lunak Primer3Plus pada situs <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> untuk mendapatkan kandidat primer dan *probe*. Setelah kandidat primer dan *probe* diperoleh, dilakukan pemilihan primer yang sesuai dengan ketentuan primer yang baik (Shen et al., 2010; Hung & Weng, 2016).

2.3 Analisis Spesifisitas Primer Secara *in Silico*

Primer dan *probe* yang terpilih dianalisis secara *in silico* untuk menguji spesifisitas primer dan tingkat kesamaan sekuens produk PCR dengan *database* nukleotida yang terdapat di GenBank NCBI (Rodríguez et al., 2015). Spesifisitas primer dianalisis secara *in silico* dengan melakukan penyejajaran sekuens primer menggunakan Primer-BLAST dan similaritas nukleotida dianalisis dengan melakukan penyejajaran sekuens nukleotida produk PCR menggunakan Nucleotide-BLAST yang terdapat pada situs <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Bustin & Huggett, 2017).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Gen *mt-CoI Rattus norvegicus*

Berdasarkan hasil penelusuran pangkalan data NCBI, hanya diperoleh satu sekuens gen *mt-CoI Rattus norvegicus*. Format FASTA gen *mt-CoI Rattus norvegicus* ditunjukkan pada Gambar 1.

```

Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete genome
NCBI Reference Sequence: NC_001665.2
GenBank Graphics
>NC_001665.2:5323-6867 Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion, complete
genome
ATGCTCGTAAACCGTTGACTCTTTCAACTAACCCAAAGATATCGGAAACCTCTACCTATTATTTGGAG
CCTGAGCAGGAATAGTAGGGACAGCTTTAAGTATTCTAATTCGAGCTGAAGTACAGCAGCCAGGCGCACT
CCTAGGAGATGACCAAACTATAATGTCATCGTACAGCCATGCATTGTAATAATTTTCTTTATAGTA
ATACCTATAAATTTGGAGGCTTCGGGAACTGACTGTACCACATAAATTTGGAGCCCTGATATAGCAT
TCCACGAAATAAATAACATAAGCTTTGACTGCTTCTCCATCATTCTACTCCTTTTAGCATCCTCCAT
AGTAGAAGCTGGAGCTGGAAACAGGATGAACAGTATATCCCCCTTAGCCGAAACCTAGCCCATGCTGGA
GCATCGTAGATTTAACTATTTTTCCCTCCACCTAGCCGGGGTGTCTTCTATCTTAGGAGCTATCAACT
TTATCACCACATCATTAAATAAAAACCCCTGCTATAACCAATATCAGACACCTCTCTTTGTATGATC
CGTACTAATACAGCCGCTCTACTACTTCTCTCACTGCCAGTATTAGCAGCAGGTATCAGTACTACTCCTT
ACAGACCGAAATCTAAATACTACTTCTTCCAGCCCGCTGGAGGTGGAGACCCTTATCAACACC
TATTCTGATTCTTCGGCCACCCAGAAGTGCATCTTAATTTCTTCAGGGTTTGAATTTTACATGT
AGTTACCTATTACTCGGAAAAAAGAACCCCTTCGGATATAGGTATGGTATGAGCCATAATATCTATT
GGCTTCTAGGATTTATGTATGAGCAGTATCAGATTCACAGTAGGCCATGATGAGACCCGAGCCCT
ACTTTACATCTGCCACTATAATTATCGCAATTCACAGGCGTAAAGTATTGAGTACTGCTACACT
ACATGGAGGAAATCAAATGATCCCCGCCATATATGAGCCTTAGGGTTATCTTCTTATCAGTA
GGGGCCATAACGGGATCGTACTATCAACTCATCCCTTGACATTGTACTTATGATACATACTATGTAG
TAGCTCACTTCCACTATGCTTATCTATAGGAGCAGTATTCCGCATCATAGCTGGCTTCGCTCACTGATT
CCCCTATTCTCAGGCTATACCCTAAATGACACATGAGCAAAAGCCACTTTGCCATTATTTGTAGGT
GTAACATAAATCTTTCTCAACACTTCTAGGATTAGCAGGGATACCTCGTCTTACTCTGATTATC
CAGATGCTTACACCCACATGAAATACAGTCTCCTCTATAGGCTCATTCTCATCTTACGGCCGCTCTGT
AATGATCTTCATGATTGAGAAGCCTTCGCATCAAAACGAGGAGTACTCTCAATTTCTACTCTCAACT
AACCTAGAATGACTGCATGGATGCCCCACCCCTACCACACATTGGAAGAACCTTCTATGTAAGGTTA
AATAA

```

Gambar 1. Format FASTA gen *mt-CoI Rattus norvegicus*.

Gen *mt-CoI* pada *Rattus norvegicus* memiliki panjang sekuens 1545 bp (*base pair* atau pasangan basa) dan gen ini merupakan bagian dari DNA mitokondria. Gen *mt-CoI* mengkode enzim *Cytochrome C Oxidase Subunit I* yang berperan dalam transport elektron yang menjalankan fosforilasi oksidatif di mitokondria (Timón-Gómez et al., 2018). Sekuens gen *mt-CoI* diperoleh dari pangkalan data NCBI harus diubah ke format FASTA agar dapat digunakan sebagai *template* dalam desain primer menggunakan perangkat lunak Primer3Plus. Format FASTA adalah format *text-based* untuk menunjukkan sekuens nukleotida tanpa penomoran.

3.2 Desain Primer Menggunakan Primer3Plus

Desain primer yang dilakukan terhadap sekuens gen *mt-CoI Rattus norvegicus* (NC_001665.2) menghasilkan lima kandidat pasangan primer dan *probe* (Tabel 1). Berdasarkan seleksi terhadap lima kandidat pasangan primer *probe*, kandidat primer *probe* 4 dipilih karena sesuai memenuhi kriteria primer yang baik.

Tabel 1. Kandidat primer dan *probe* gen *mt-CoI Rattus norvegicus*.

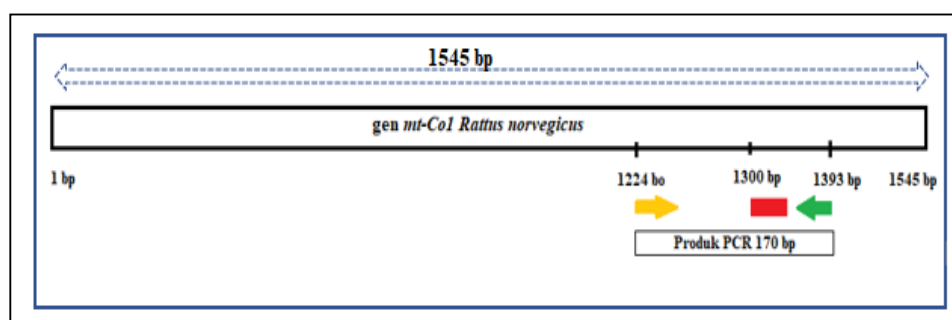
Sekuens (5' --> 3')	Karakteristik					
	Panjang Basa (nt)	Tm (°C)	GC (%)	Self 3' complementarity	Produk PCR (bp)	
Kandidat Primer Probe 1						
<i>Forward</i>	GGAGCAGTATTCGCCATCAT	20	60.1	50	3.0	244
<i>Reverse</i>	CGGCCGTAAGTGAGATGAAT	20	60.1	50	2.0	
<i>Probe</i>	GCAGGGATACCTCGTCGTTA	20	60.1	55	2.0	

	Sekuens (5' --> 3')	Karakteristik				
		Panjang Basa (nt)	Tm (°C)	GC (%)	Self 3' complementarity	Produk PCR (bp)
Kandidat Primer Probe 2						
<i>Forward</i>	GGAGCAGTATTCGCCATCAT	20	60.1	50	3.0	167
<i>Reverse</i>	CGACGAGGTATCCCTGCTAA	20	60.2	55	1.0	
<i>Probe</i>	ATGAGCAAAAGCCCACTTTG	20	60.2	45	2.0	
Kandidat Primer Probe 3						
<i>Forward</i>	AGCCGGGGTGTCTTCTATCT	20	60.1	55	0.0	236
<i>Reverse</i>	AAAGGATTGGGTCTCCACCT	20	59.8	50	2.0	
<i>Probe</i>	ACCCCTGCTATAACCCAAT	20	59.6	50	3.0	
Kandidat Primer Probe 4						
<i>Forward</i>	ATGAGCAAAAGCCCACTTTG	20	60.2	45	2.0	170
<i>Reverse</i>	CGGCCGTAAGTGAGATGAAT	20	60.1	50	2.0	
<i>Probe</i>	GCAGGGATACCTCGTCGTTA	20	60.1	55	2.0	
Kandidat Primer Probe 5						
<i>Forward</i>	GGAGCAGTATTCGCCATCAT	20	60.1	50	3.0	224
<i>Reverse</i>	ACGACGAGGTATCCCTGCTA	20	59.7	55	2.0	
<i>Probe</i>	ATGAGCAAAAGCCCACTTTG	20	60.2	45	2.0	

Desain primer harus memperhatikan beberapa ketentuan seperti panjang primer, *melting temperature* (TM), persentase basa GC, dan *Self 3' complementarity*. Panjang primer yang baik adalah 18-24 nukleotida, karena primer yang terlalu pendek akan kurang spesifik (Hung & Weng, 2016). *Melting temperature* (Tm) yang baik berada pada rentang suhu 57-63°C dan persentase basa GC masing-masing sekuens sebesar 45-55% (Shen et al., 2010). Semakin kecil *self 3' complementarity* akan semakin baik. *Self 3' complementarity* maksimum adalah 3 (Shen et al., 2010) dan maksimum pengulangan satu basa yang sama secara berurutan adalah 4 basa (Lorenz, 2012). Hal lain yang perlu diperhatikan dalam mendesain primer adalah struktur *dimer* pada primer, jumlah serta posisi basa G dan C pada sekuens primer yang dipilih (Saraswati et al., 2019). Keberadaan basa G atau C akan membantu untuk pengikatan yang spesifik karena ikatan antara basa G dan C yang lebih kuat dibandingkan dengan ikatan antara basa A dan T (Borah, 2011). Namun, jumlah basa G dan C yang lebih dari tiga pada lima basa terakhir di ujung 3' primer harus dihindari (Borah, 2011). Jumlah ikatan antara basa G dan C yang banyak akan mendorong primer untuk membentuk *dimer* sehingga akan mempengaruhi konsentrasi DNA hasil amplifikasi (Saraswati et al., 2019). Berdasarkan ketentuan tersebut maka dipilih satu pasang primer dan *probe* yaitu kandidat primer *probe 4*. Kandidat primer dan *probe 4* memiliki panjang basa 20 nukleotida pada masing-masing

sekuens yang terdiri dari 45%-55% basa G dan C dan memiliki $T_m \sim 60^\circ\text{C}$ serta *self 3' complementarity* sebanyak 2.

Posisi *probe* berada di antara primer *forward* dan primer *reverse* yang ditunjukkan pada Gambar 2. *Probe* merupakan oligonukleotida berlabel ganda dengan *reporter* fluoresen pada ujung 5' dan *quencher* pada ujung 3' (Rodríguez-Lázaro et al., 2013). Dalam proses amplifikasi DNA menggunakan *real-time* PCR, *probe* hanya akan menempel pada sekuens yang merupakan komplemennya. *Probe* yang menempel pada sekuens target komplemennya akan terdegradasi oleh aktivitas 5'→3' *exonuclease* dari *taq polymerase*. *Probe* tidak akan terdegradasi apabila tidak ada sekuens target yang merupakan komplemen dari *probe* spesifik sehingga *reporter* yang menempel pada *probe* akan padam (Estalilla et al., 2000; VanGuilder et al., 2008). Oleh karena itu, deteksi *Rattus norvegicus* menggunakan primer dan *probe* ini diharapkan lebih spesifik dibandingkan deteksi menggunakan *endpoint* PCR.



Gambar 2. Skema posisi relatif primer *probe* terhadap gen *mt-Co1*. Panah berwarna kuning menunjukkan posisi primer *forward*; kotak merah menunjukkan posisi *probe*; panah berwarna hijau menunjukkan posisi primer *reverse*.

3.3 Analisis Spesifisitas Primer Secara *in Silico*

Hasil penyejajaran sekuens pasangan primer menggunakan Primer-BLAST dapat dilihat pada Tabel 2. Primer-BLAST merupakan alat yang digunakan untuk mendesain primer yang spesifik. Namun, Primer-BLAST dapat digunakan juga untuk menganalisis spesifisitas primer dibandingkan terhadap sekuens yang ada di dalam *database* NCBI (Ye et al., 2012).

Tabel 2. Hasil penyejajaran sekuens pasangan primer gen *mt-Co1* *Rattus norvegicus*.

Sekuens primer (5'→3')	Jumlah Target Jenis yang Dikenali				Total
	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Rattus nitidus</i>	<i>Rattus sp</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	
<i>Forward:</i> ATGAGCAAAAAGCCCACTTTG	312	1	1	1	315
<i>Reverse:</i> CGGCCGTAAGTGAGATGAAT	Produk PCR=170 bp	Produk PCR=170 bp	Produk PCR=170 bp	Produk PCR=42 bp	

Oleh karena itu, kriteria paling penting yang harus dimiliki oleh primer adalah spesifik terhadap target (Ye et al., 2012). Idealnya primer hanya akan menempel pada target yang diinginkan. Hasil

pengujian tidak dapat mengidentifikasi spesies secara spesifik apabila primer dapat menempel pada target yang tidak diinginkan saat amplifikasi DNA (Ye et al., 2012). Dari hasil Primer-BLAST terhadap pasangan primer yang terpilih, didapatkan bahwa primer dapat mengenali sebagian besar gen *Rattus norvegicus* yang terdapat di dalam pangkalan data NCBI. Selain itu, primer tersebut juga mengenali gen pada tikus himalaya (*Rattus nitidus*) dan *Rattus* sp. yang menunjukkan bahwa primer masih dapat menempel pada gen *mt-CoI* tikus jenis lain. Hal yang menarik adalah terdapat kemungkinan bahwa primer tersebut dapat menempel pada genom *Bacillus megaterium*. Namun, hasil tersebut dapat diabaikan karena produk PCR yang dihasilkan berukuran 42 bp dan hanya primer *forward* yang dapat menempel pada genom *Bacillus megaterium* menyebabkan elongasi tidak terjadi, sehingga tidak terdeteksi pada *real-time* PCR.

Selain analisis spesifisitas primer, sekuens produk PCR dianalisis tingkat kesamaannya dengan pangkalan data nukleotida yang terdapat di GenBank NCBI. Hasil penyejajaran menunjukkan bahwa sekuens nukleotida produk PCR hanya memiliki kesamaan dengan *Rattus norvegicus* (Tabel 3). Produk PCR hasil amplifikasi oleh pasangan primer *probe* yang dipilih memiliki ukuran 170 bp. Ukuran optimum untuk produk PCR 50-150 bp (Debode et al., 2017). Akan tetapi, produk PCR berukuran hingga 400 bp juga dapat diamplifikasi dengan baik (Holm et al., 2021), sehingga produk PCR sepanjang 170 bp yang dihasilkan oleh pasangan primer *probe* yang dipilih masih teramplifikasi dengan baik.

Tabel 3. Hasil penyejajaran sekuens nukleotida produk PCR.

Sekuens nukleotida (5'→3')	Jumlah Target Jenis yang Dikenali		
	<i>Rattus norvegicus</i>	Jenis selain <i>Rattus norvegicus</i>	Total
ATGAGCAAAAGCCCACTTTGCCATT ATATTTGTAGGTGTAACATAACAT TCTTTCCTCAACACTTCCTAGGATT AGCAGGGATACCTCGTCTACTCT GATTATCCAGATGCTTACACCACAT GAAATACAGTCTCCTCTATAGGCTC ATTCATCTCACTTACGG CCG	100 <i>Query Cover</i> =100% <i>% Ident.</i> = 100% <i>E-Value</i> = 10 ⁻⁸¹	0	100

Penyejajaran menggunakan Nucleotide-BLAST memungkinkan melakukan pencarian kesamaan urutan terhadap beberapa pangkalan data yang terdapat di GenBank NCBI. Dari hasil penyejajaran sekuens produk PCR diperoleh *Query Cover* dan *percent identity* sebesar 100% serta *Expectation Value* (*E-value*) sebesar 10⁻⁸¹. *Query Cover* adalah persentase dari panjang sekuens yang sama dengan pangkalan data pada NCBI. *Percent identity* adalah persentase tertinggi dari kesesuaian antara sekuens yang dicari dengan sekuens yang ada di NCBI (Newell et al., 2013). *E-value* merupakan merupakan indikator probabilitas untuk menemukan kecocokan secara kebetulan, semakin kecil nilainya menunjukkan tingkat homologi sekuens yang semakin tinggi (Kerfeld & Scott, 2011). Tingkat kesamaan sekuens nukleotida yang baik apabila *Query Cover* 100%, *percent identity* memberikan hasil 100%, dan *E-value* harus bernilai ≤ 0.01 (Rodríguez et al., 2015).

4. Kesimpulan

Primer *forward* dengan sekuens 5'-ATGAGCAAAAGCCCACTTTG-3', primer *reverse* dengan sekuens 5'-CGGCCGTAAGTGAGATGAAT-3', dan *probe* dengan sekuens 5'-

GCAGGGATACCTCGTCGTTA-3' berhasil didesain untuk mengamplifikasi gen *mt-Co1* pada tikus got (*Rattus norvegicus*) dengan produk PCR berukuran 170 bp. Hasil uji kinerja secara *in silico* menunjukkan primer dan *probe* yang didesain tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi tikus got secara spesifik.

Untuk pembuktian bahwa pasangan primer dan *probe* tersebut dapat digunakan dalam deteksi daging tikus got dalam pangan olahan perlu dilakukan validasi secara empiris dengan eksperimen di laboratorium. Namun demikian, pasangan primer dan *probe* yang didesain dan dianalisis komprehensif secara *in silico* dapat meningkatkan keberhasilan dalam pengembangan metode uji deteksi cemaran daging tikus got menggunakan *real-time* PCR dan *probe*.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, BPOM yang telah memfasilitasi untuk mengikuti diklat penulisan Karya Tulis Ilmiah. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada fasilitator dan pembimbing dari Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah berbagi pengalaman serta pengetahuan selama pelaksanaan diklat.

Daftar Referensi

- Ahamad, M. N. U., Ali, M. E., Hossain, M. A. M., Asing, A., Sultana, S., & Jahurul, M. H. A. (2017). Multiplex PCR assay discriminates rabbit, rat and squirrel meat in food chain. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(12), 2043–2057.
- Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Hoper, D., Jenckel, M., & Pohlmann, A. (2016). New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1314–1315. doi: 10.3201/eid2207.160179
- Ali, M. E., Razzak, M. A., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Amin, M. Al, Rashid, N. R. A., & Asing. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, 177, 214–224.
- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134–136.
- Bobrov, A. G., Kirillina, O., Vadyvaloo, V., Koestler, B. J., Hinz, A. K., Mack, D., ... Perry, R. D. (2015). The *Yersinia pestis* HmsCDE regulatory system is essential for blockage of the oriental rat flea (*Xenopsylla cheopis*), a classic plague vector. *Environmental Microbiology*, 17(4), 947–959. doi: 10.1111/1462-2920.12419
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14(November), 19–28.
- Cahyadi, M., Wibowo, T., Pramono, A., & Abdurrahman, Z. H. (2020). A novel multiplex-pcr assay to detect three non-halal meats contained in meatball using mitochondrial 12s rrna gene. *Food Science of Animal Resources*, 40(4), 628–635.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Diseases directly transmitted by rodents*. <https://www.cdc.gov/rodents/diseases/direct.html>
- Chen, X., Ran, D., Zeng, L., Xin, M., (2020). Immunoassay of cooked wild rat meat by ELISA with a highly specific antibody targeting rat heat-resistant proteins. *Food and Agricultural Immunology*, 31 (1), <https://doi.org/10.1080/09540105.2020.1740180>
- Debode, F., Marien, A., Janssen, É., Bragard, C., & Berben, G. (2017). *The influence of amplicon length on real-time PCR results Frédéric.pdf*. 21(1), 3–11.
- Estalilla, O. C., Medeiros, L. J., Manning, J. T., & Luthra, R. (2000). 5' → 3' Exonuclease-based real-time PCR assays for detecting the t(14;18)(q32;21): A survey of 162

- malignant lymphomas and reactive specimens. *Modern Pathology*, 13(6), 661–666.
- Geller, J., Meyer, C., Parker, M., & Hawk, H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 851–861.
- Herrero, B., Madriñán, M., Vieites, J. M., & Espiñeira, M. (2010). Authentication of atlantic cod (*Gadus morhua*) Using real time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4794–4799.
- Holm, W. Van, Ghesquière, J., Boon, N., Verspecht, T., Bernaerts, K., Zayed, N., Chatzigiannidou, I., & Teughels, W. (2021). A Viability Quantitative PCR Dilemma: Are Longer Amplicons Better? *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5), 1–11.
- Hung, J. H., & Weng, Z. (2016). Designing polymerase chain reaction primers using Primer3Plus. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(9), 821–826.
- Kerfeld, C. A., & Scott, K. M. (2011). Using BLAST to teach “E-value-tionary” concepts. *PLoS Biology*, 9(2), 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001014>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–15.
- Newell, P. D., Fricker, A. D., Roco, C. A., Chandransu, P., & Merkel, S. M. (2013). A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 14(2), 238–243.
- Nuraini, H., Primasari, A., Andreas, E., & Sumantri, C. (2012). The use of cytochrome b gene as a specific marker of the rat meat (*Rattus norvegicus*) on meat and meat products. *Media Peternakan*, 35(1), 15–20.
- Purcell, R. V., Pearson, J., Frizelle, F. A., & Keenan, J. I. (2016). Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Scientific Reports*, 6(September), 1–8.
- Rodrigues, M. S., Morelli, K. A., & Jansen, A. M. (2017). Cytochrome c oxidase subunit I gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–18.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., & Hernández, M. (2013). Real-time PCR in food science: PCR diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2), 39–44.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1275, vii.
- Roswiem, A. P., & Septiani, T. (2018). Identifikasi Daging Tikus Pada Produk Baso Dengan Metode Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Jurnal Kedokteran YARSI*, 26(2), 058–065.
- Saraswati, H., Seprianto, S., & 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.
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., & Zhang, C. (2010). MPprimer: A program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics*, 11.
- Su, Y., Wang, S., Guo, J., Xue, B., Xu, L., & Que, Y. (2013). A TaqMan real-time PCR assay for detection and quantification of *sporisorium scitamineum* in sugarcane. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Suparman, S. (2016). Desain Primer PCR Secara In Silico Untuk Amplifikasi Gen COI Pada

- Kupu-Kupu *Papilio ulysses* Linnaeus Dari Pulau Bacan. *Jurnal Pendidikan Matematika Dan IPA*, 7(1), 14.
- Timón-Gómez, A., Nývltová, E., Abriata, L. A., Vila, A. J., Hosler, J., & Barrientos, A. (2018). Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis: Recent Developments. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148.
- Tobe, S. S., Kitchener, A., & Linacre, A. (2009). Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification-An answer to the debate. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 306–307.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619–626.
- 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).