

DESAIN PRIMER MMP-8 dan IL-6 UNTUK ANALISIS EKSPRESI GEN JARINGAN GUSI *Rattus norvegicus* DENGAN qRT-PCR

Yasmine Dwinda Erizal*, Muhammad Farikh, Vraya Tiranissa, Windi Yunita Sari, Bintang
Fadhil Ramadhan, Siska Alicia Farma
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar, Kota Padang Indonesia
e-mail: yasminedwinda@gmail.com

Abstrak

Matrix Metalloproteinase 8 (MMP-8) dan Interleukin 6 (IL-6) merupakan dua gen penting dalam menjadi mediator radang dan berperan pada kasus inflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain dua kandidat primer spesifik untuk pengujian ekspresi gen dengan metode qRT-PCR pada *Rattus norvegicus* yang mengalami peradangan atau inflamasi gusi. Desain primer dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Geneious Prime dan primer BLAST untuk mengetahui kualitas primer melalui ukuran produk PCR, Panjang primer, *melting temperature* (Tm), dan %GC serta memastikan primer yang dihasilkan hanya menempel pada target genom *Rattus norvegicus*. Hasil menunjukkan bahwa ukuran produk MMP-8 forward CGGGGTATTGGAGGAGATGC; reverse CAGGGTTGTCTGAAGGTCCATA adalah 241 bp dengan Panjang primer 20-22 nukleotida, %GC antara 50-60% dan Tm tidak lebih dari 60 °C, dan ukuran produk IL-6 forward AGAGACTTCCAGCCAGTTGC; reverse TGCCATTGCACAACTCTTTTC adalah 199 bp dengan Panjang primer 20-21 nukleotida, %GC antara 42,86-55% dan Tm tidak lebih dari 60 °C. Hasil primer BLAST menunjukkan bahwa kedua pasangan primer bersifat spesifik dan layak menjadi kandidat primer untuk pengujian qRT-PCR dalam studi ekspresi gen terakut peradangan atau inflamasi gusi.

Keywords: *desain primer; MMP-8, IL-6; qRT-PCR; Rattus norvegicus*

Abstract

Matrix Metalloproteinase 8 (MMP-8) and Interleukin 6 (IL-6) are two important genes that mediate inflammation and play a role in inflammatory cases. This study aims to design two specific primer candidates for testing gene expression using the qRT-PCR method in *Rattus norvegicus* experiencing inflammation and gingivitis. Primer design was performed using Geneious Prime software and BLAST primers to determine primer quality through PCR product size, primer length, melting temperature (Tm), and %GC, as well as to ensure that the resulting primers only bind to the *Rattus norvegicus* genome target. The results showed that the size of the MMP-8 forward product CGGGGTATTGGAGGAGATGC; reverse CAGGGTTGTCTGAAGGTCCATA was 241 bp with a primer length of 20-22 nucleotides, %GC between 50-60%, and Tm not more than 60°C, and the size of the IL-6 product forward AGAGACTTCCAGCCAGTTGC; reverse TGCCATTGCACAACTCTTTTC is 199 bp with a primer length of 20-21 nucleotides, %GC between 42.86-55% and Tm not more than 60°C. BLAST primer results indicate that both primer pairs are specific and suitable as candidate primers for qRT-PCR testing in studies of inflammation-related gene expression and gingival inflammation.

Keywords: *design primer; MMP-8, IL-6, qRT-PCR; Rattus norvegicus*

1. PENDAHULUAN

Peradangan atau inflamasi merupakan bentuk respon tubuh terhadap kerusakan pada jaringan yang dapat disebabkan oleh luka fisik, infeksi bakteri ataupun interaksi dengan bahan kimia untuk memperbaiki kerusakan dan mengembalikan kondisi tubuh seperti sebelumnya (Isromi et al., 2023). Proses inflamasi melibatkan proses kompleks dengan respon tubuh yang umumnya ditandai dan dapat dideteksi dengan mediator kimiawi yang disebut juga dengan sitokin proinflamasi (Fратиwi et al., 2022). Mediator dalam proses inflamasi jaringan periodontal pada gusi yang dapat menjadi parameter spesifik diantaranya adalah MMP-8 dan IL-6 (Meilawaty et al., 2020).

MMP-8 merupakan sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam menunjukkan adanya kerusakan jaringan ikat pada gingiva. Pada gingivitis aktivitas MMP-8 dihasilkan oleh aktivitas pertumbuhan leukosit PMN, yaitu sel radang yang menandakan adanya luka atau inflamasi (Malaha et al., 2023). Dalam prosesnya sel makrofag dan fibroblas gingiva akan aktif untuk akhirnya memproduksi MMP dan TIMP sebagai regulasinya (Indriani et al., 2018).

Sedangkan IL-6 merupakan mediator inflamasi yang berperan penting dalam respons inflamasi akut maupun kronik, aktivasi limfosit dan regulasi inflamasi jangka Panjang. Selain itu, IL-6 juga memiliki beberapa peran dalam respons imunitas adaptif oleh limfosit T dan B untuk menginduksi migrasi neutrophil dan meningkatkan suhu tubuh untuk mempertahankan tubuh dalam melawan infeksi virus yang terjadi (Cindrayani et al., 2023). Menurut Putra et al. (2024), peningkatan IL-6 secara terus menerus dapat mempengaruhi sistem imun tubuh dan mempercepat kerusakan jaringan yang mengakibatkan inflamasi kronik.

Analisis ekspresi gen menggunakan metode *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) merupakan metode unggulan dalam penelitian inflamasi karena memiliki rentang kualifikasi yang luas dan memiliki spesifikasi yang baik. Dalam Analisa menggunakan metode ini beberapa hal dapat mempengaruhi keberhasilannya diantaranya dipengaruhi oleh suhu leleh (T_m) yang tepat, komposisi

GC yang seimbang dan ada tidaknya dimer yang terbentuk pada hasil yang ditunjukkan. Dalam pembuatan design primer digunakan software primer-BLAST (NCBI) untuk mempercepat identifikasi kandidat primer yang sesuai dengan kriteria dan spesifikasi genomic yang ditargetkan (Ilmi et al., 2025).

Meskipun design primer telah banyak digunakan untuk berbagai target gen, belum ada studi sistematis khusus yang merancang primer untuk MMP-8 dan IL-6 khususnya pada hewan uji tikus *Rattus norvegicus*. Primer yang sesuai dengan target hewan uji sangat penting diperhasikan untuk memastikan akurasi dan konsistensi hasil pengukuran ekspresi gen dalam pengujian inflamasi dengan hewan uji. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain kandidat primer qRT-PCR spesifik gen mengenai inflamasi MMP-8 dan IL-6 pada *Rattus norvegicus*. Penelitian ini menggunakan analisis ukuran produk PCR, Panjang primer, melting temperature (T_m), dan %GC dan diharapkan dapat menjadi acuan bagi peneliti molecular lanjutan dalam bidang imunologi khususnya yang menggunakan hewan uji *Rattus norvegicus* serta menguatkan pengembangan metode dengan ekspresi gen.

2. METODE PENELITIAN

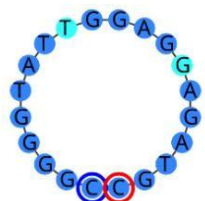
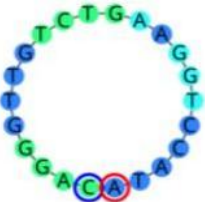
Penelitian ini dikerjakan pada bulan April – Juni 2024 di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang dengan menggunakan perangkat lunak Geneious Prime dan primer BLAST. Bahan yang digunakan pada penelitian ini Adalah berupa sekuen gen-gen target inflamasi MMP-8 dan IL-6 yang diunduh dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang dipilih berdasarkan sekuens yang berasal dari *full length messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) *Rattus norvegicus*. Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian yaitu *Geneious Prime* untuk menunjukkan sekuens nukleotida atau asam amino yang kemudian akan dianalisis dengan primer-BLAST.

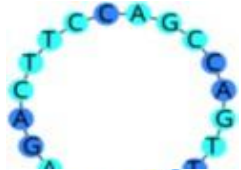
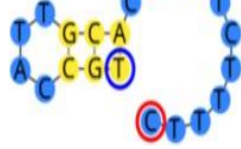
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap awal dari pembuatan desain primer dimulai dengan mencari database gen MMP-8 dan IL-6 pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang merupakan suatu *platform* untuk menyajikan data genomik komprehensif yang banyak diakses dalam penelitian bioinformatika. Sedangkan sekuens gen target yang digunakan ialah *full length* mRNA *Rattus norvegicus* karena bertujuan untuk mengkuantifikasikan ekspresi gen. Kemudian nomor akses gen disimpan dalam NCBI untuk mengenali entri sekuens dari genom, mRNA hingga produk protein. Setelah mendapat nomor akses, selanjutnya sekuens diinput untuk mendapatkan kandidat protein.

Perangkat lunak Geneious Prime menghasilkan dua pasang kandidat primer untuk mengamplifikasi mRNA gen MMP-8 dan IL-6 pada *Rattus norvegicus* dua pasang primer yang dirancang oleh primer BLAST menunjukkan variabilitas dalam hal ukuran produk PCR, panjang primer, T_m , dan persentase GC (Tabel 1). Ukuran produk yang dihasilkan oleh pasangan primer adalah 241bp untuk MMP-8 dan 199 bp untuk IL-6. Selanjutnya suhu leleh (T_m) pada pasangan primer berada pada $59,43^\circ\text{C}$ - $59,96^\circ\text{C}$ untuk MMP-8 dan $57,9^\circ\text{C}$ - $59,96^\circ\text{C}$ untuk IL-6.

Tabel 1. Hasil Desain Primer MMP-8 dan IL-6

No	Deskripsi Primer	DNA Fold	Ukuran Amplikon
1	<i>Rattus norvegicus</i> , Matrix Metalloproteinase (MMP-8) (NM_022221.2) Forward CGGGGTATTGGAGGAGAT GC Length: 20 %GC: 60 TM=59,96 Hairpin Tm: None		241 bp
2	<i>Rattus norvegicus</i> , Matrix Metalloproteinase (MMP-8) (NM_022221.2) Reverse CAGGGTTGTCTGAAGGTCC ATA Length: 22 %GC: 50 TM=59,43 Hairpin Tm: None		241 bp

No	Deskripsi Primer	DNA Fold	Ukuran Amplikon
3	<i>Rattus norvegicus</i> , Interleukin 6 (IL-6) (NM_012598.2) Forward AGAGACTTCCAGCCAGTTG C Length: 20 %GC: 55 TM=59,96 Hairpin Tm: Non		199 bp
4	<i>Rattus norvegicus</i> , Interleukin 6 (IL-6) (NM_012598.2) Reverse TGCCATTGCACAACTCTTT TC Length: 21 %GC: 42,86 TM=57,90 Hairpin Tm: None		199 bp

Hasil desain primer MMP-8 dan IL-6 pada *Rattus norvegicus* menunjukkan seluruh pasangan primer memiliki kriteria baik menurut pedoman desain primer secara internasional sehingga dapat digunakan dalam pengujian qRT-PCR. Panjang primer yang didapatkan berada pada kisaran 18-25 yang merupakan ukuran optimal dalam menjamin keseimbangan antara spesifisitas pengikatan dan efisiensi amplifikasi. Primer yang memiliki Panjang dibawah 18 berpotensi menyebabkan terjadinya pengikatan yang nonspesifik, sedangkan primer yang terlalu Panjang dapat meningkatkan resiko terbentuknya produk sekunder yang dapat menurunkan efisiensi reaksi PCR (Thornton & Basu, 2011). Persentase kandungan GC (%GC) berkisar 42,86-60% merupakan hasil optimal sesuai dengan rekomendasi desain primer qRT-PCR, kandungan yang optimal berperan penting karena berpengaruh pada ikatan primer yang terjadi. Nilai GC yang terlalu rendah dapat mempengaruhi proses *annealing*, sedangkan nilai GC yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kesulitan dalam proses pembentukan struktur sekunder yang akan mempengaruhi proses amplifikasi.

Suhu leleh (Tm) setiap pasangan primer menunjukkan perbedaan yang $<2^{\circ}\text{C}$, yang menunjukkan kesesuaian pasangan primer *forward* dan *reverse* dalam satu reaksi PCR. Perbedaan tm yang kecil menunjukkan kedua primer dapat berikatan dengan baik pada suhu *annealing* yang sama, sehingga meningkatkan sinkronisasi amplifikasi dan meminimalkan pembentukan produk non spesifik yang tidak diinginkan. Sehingga semua parameter tersebut menunjukkan hasil desain primer berada pada batas optimal

dengan efisiensi amplifikasi yang tinggi dan spesifisitas target yang baik. Selain itu tidak ditemukannya hairpin (struktur sekunder intramolekuler) dan dimer primer yang signifikan mengindikasikan bahwa primer yang dirancang memiliki proses amplifikasi yang optimal dan konsisten. Ukuran amplicon yang dihasilkan berkisar 199-241 bp juga menunjukkan rentang yang ideal sehingga dapat meminimalisir risiko produk sampingan yang dihasilkan saat proses amplifikasi (Bustin & Huggett, 2017). Sehingga dengan hasil desain primer yang memenuhi kriteria pedoman menunjukkan rancangan primer MMP-8 dan IL-6 ini dapat dijadikan kandidat primer yang baik untuk uji qRT-PCR pada *Rattus norvegicus*.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil desain primer MMP-8 dan IL-6 pada *Rattus norvegicus* menggunakan perangkat lunak Geneious prime, didapatkan dua pasang primer yang memenuhi kriteria primer yang baik dan sesuai dengan pedoman untuk aplikasi qRT-PCR. Seluruh pasangan primer memiliki Panjang primer dalam rentang optimal yaitu 18-25, %GC antara 42,86-60% dan Tm seimbang dengan selisih kurang dari 2°C antar setiap pasangan primer. Selain itu, tidak ditemukannya juga struktur sekunder lain seperti hairpin yang dapat mengganggu proses efisiensi amplifikasi. Ukuran amplicon yang dihasilkan juga berada pada rentang ideal yakni 199-241 bp. Dengan hasil tersebut, produk desain primer yang dihasilkan dapat menjadi kandidat primer yang baik untuk Analisa kuantifikasi ekspresi gen MMP-8 dan IL-6 pada *Rattus norvegicus*.

4.2 Saran

Saran dari penelitian ini untuk melakukan tahap validasi eksperimental terhadap primer yang telah dirancang melalui uji lainnya, seperti uji efisiensi amplifikasi, uji spesifisitas menggunakan analisis *melt curve* dan uji elektroforesis untuk memastikan ukuran produk PCR sesuai. Penelitian lanjutan juga dapat mengembangkan desain primer untuk *housekeeping gene* yang sesuai untuk mendukung analisis ekspresi gen secara kuantitatif dan komprehensif.

5. REFERENSI

- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). *Review Article : qPCR primer design revisited. Biomolecular Detection and Quantification*, 14(March), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Cindrayani, S., Sukmana, D. J., Hadiatun, N., & Aini. (2023). Literature Review : Hubungan dan Peranan Interleukin-6 (IL-6) pada Penderita COVID-19 1(3), 76–80.
- Fратиwi, N., Saranani, S., Agastia, G., & Isrul, M. (2022). Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dan Pengaruhnya Terhadap Kadar Interleukin 6 (IL-6) Pada Tikus Jantan Galur Wistar 1(2).
- Iلمي, A. N., Pujiyanti, A. S., & Amirullah. (2025). 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. 12(1), 118–128.
- Indriani, L., Dharmautama, M., Machmud, E., Djide, M., & Hatta, M. (2018). Perubahan rasio ekspresi mRNA MMP-8 / TIMP- 1 setelah aplikasi gel ekstrak bunga rosella 10 % pada pasien dengan gingivitis setelah pemasangan mahkota tiruan akrilik. 2(7), 56–61.
- Isromi, T., Winahyu, D., & Tutik. (2023). Uji Efektivitas Ekstrak Kulit Petai (*Parkia speciosa*) Sebagai Antiinflamasi Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar Yang di Induksi Karagenan. 10(3), 1605–1614.
- Malaha, N., Sartika, D., Pannyiwi, R., Zaenal, & Zakiah, V. (2023). Efektifitas Sediaan Biospray Revolutik Dalam Menurunkan Jumlah PMNL Dalam Proses Penyembuhan Luka. 2, 145–152.
- Meilawaty, Z., Shita, A., Kuncaraningtyas, P., Dharmayanti, A., & Hamzah, Z. (2020). Potensi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva pada model tikus dengan disfungsi ovarium dan periodontitis Zahara. 105–112. <https://doi.org/10.24198/jkg.v32i2.27466>
- Putra, I. G. E. P., Ulfah, M., Nurhayati, N., & Helianti, I. (2024). Coproduction of alkaline protease and xylanase from genetically modified Indonesian local *Bacillus halodurans* CM1 using corncob as an inducing substrate. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 31(4), 103947. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103947>
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). *Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software*. 39(2), 145–154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>