

Desain primer dan analisis *in silico* gen *glutathione peroxidase-1* pada *Rattus norvegicus*

Syahrul Ramadhanil¹, Frisca Rinaldi Putri¹, Siska Alicia Farma^{1,*}

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang,
Sumatera Barat, Indonesia

*korespondensi email: siskaalicia@fmipa.upn.ac.id

ABSTRAK

Hipoksia merupakan keadaan patologis di dalam tubuh yang disebabkan oleh kurangnya asupan oksigen di dalam sel atau jaringan yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel. Hipoksia mengkode protein faktor transkripsi yang disebut dengan *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1 α) yang dapat meningkatkan pembentukan dan pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) dari dalam mitokondria. Pengembangan metode uji deteksi gen yang dapat menurunkan kadar HIF-1 α sangat diperlukan. Salah satu metode yang mudah dan cepat dalam mengidentifikasi gen menggunakan *Rattus norvegicus* ialah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Desain primer dan analisis *in silico* merupakan langkah awal dalam pengembangan metode deteksi gen. Studi ini bertujuan mendesain primer untuk deteksi gen *glutathione peroxidase-1* (Gpx1) pada *Rattus norvegicus* lalu dianalisis *in silico*. Sekuens gen Gpx1 *Rattus norvegicus* (NC_030826) diperoleh dari pangkalan data *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Primer didesain menggunakan perangkat lunak *Geneious Prime*. Selanjutnya, beberapa kandidat primer dianalisis spesifisitasnya terhadap gen Gpx1 secara *in silico* menggunakan perangkat lunak, yaitu Primer-BLAST. Primer yang spesifik terhadap gen Gpx1 pada *Rattus norvegicus* berhasil didesain dengan sekuens primer forward 5'-AAGGCTCACCCGCTCTTTAC- 3'; sekuens primer reverse 5'-TGGAACACCGTCTGGACCTA-3'.

Kata kunci: desain primer; Gpx1; *Rattus norvegicus*

ABSTRACT

*Hypoxia is a pathological condition in the body caused by a lack of oxygen intake in cells or tissues which can threaten cell survival. Hypoxia encodes a transcription factor protein called hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) which can increase the formation and release of reactive oxygen species (ROS) from within the mitochondria. To support this, the development of a gene detection test method that can reduce HIF-1 α levels is urgently needed. One of the easy and fast methods for identifying genes in *Rattus norvegicus* is the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Primary design and in silico analysis are the first steps in the development of gene detection methods. This study aims to design primers for the detection of the Gox1 gene in *Rattus norvegicus* and then to analyze it in silico. The Gpx1 *Rattus norvegicus* (NC_030826) gene sequence was obtained from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database. Primer is designed using Geneious Prime software. Furthermore, several candidate primers were analyzed for their specificity for the Gpx1 gene in silico using software, namely Primer-BLAST. A specific primer for the Gpx1 gene in *Rattus norvegicus* was successfully designed with the forward primer sequence 5'-AAGGCTCACCCGCTCTTTAC- 3'; reverse primer sequence 5'-TGGAACACCGTCTGGACCTA-3'.*

Keywords: primary design; Gpx1; *Rattus norvegicus*

PENDAHULUAN

Hipoksia merupakan keadaan patologis di dalam tubuh yang disebabkan oleh kurangnya asupan oksigen di dalam sel atau jaringan yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel. Pada umumnya organisme prokariot maupun eukariot yang kompleks mempunyai mekanisme homeostasis yang adaptif untuk mengatasi hipoksia pada tingkat sistemik maupun seluler yaitu melalui penginderaan oksigen (*oxygen sensing*).¹ Pada tingkat seluler penurunan kadar oksigen akan mengakibatkan aktifnya *oxygen sensing* melalui beberapa jalur metabolik yang tidak membutuhkan oksigen seperti jalur glikolisis yang menghasilkan asam laktat. *Oxygen sensing* melibatkan protein faktor transkripsi yang disebut dengan *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1 α).² *Hypoxia inducible factor-1* terdiri dari 2 subunit yaitu α dan β yang akan diaktivasi ketika sel mengalami kekurangan oksigen. Protein HIF ini berfungsi meregulasi ekspresi sejumlah gen untuk mengembalikan homeostatis tubuh.³

Hipoksia dapat meningkatkan pembentukan dan pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) dari dalam mitokondria.^{4,5} Radikal bebas dalam jumlah berlebih mengakibatkan terjadinya stres oksidatif. Kondisi

tersebut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dimulai dengan tingkat sel, jaringan, hingga ke organ tubuh sehingga mempercepat terjadinya proses penuaan dan munculnya berbagai kondisi patologis.²

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antioksidan dalam melawan radikal bebas yang meningkat di dalam tubuh.⁶ Penangkalan radikal bebas dapat dilakukan oleh aktivitas antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang berperan penting bagi tubuh yang dapat menghambat reaksi oksidatif yang ada di dalam tubuh.⁷ Tubuh memiliki kemampuan untuk memproduksi antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GPx). Dalam keadaan normal, terdapat keseimbangan antara antioksidan endogen dan produksi radikal bebas dalam tubuh. Tetapi, mekanisme kerja GPx akan meningkat pada keadaan stress oksidatif. Enzim GPx terdiri atas empat sub unit protein yang mengkatalis reaksi reduksi hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air (H₂O).⁸

Glutathion peroksidase (GPX) merupakan enzim antioksidan utama yang berperan untuk menetralkan sifat racun dari H₂O₂. Aktivitas enzim GPX yang meningkat pada tubuh terjadi karena adanya

kenaikan jumlah ROS di dalam jaringan tubuh, sehingga tubuh menginduksi beberapa enzim antioksidan yang dapat menetralkan kerusakan akibat aktifitas ROS. Glutathione peroxidase mengkatalisis reduksi H_2O_2 dan HO_2 menjadi air dan lipid alkohol.⁹

Metode yang paling sering digunakan dalam deteksi pada tikus ialah pengujian berbasis DNA yang menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Polymerase Chain Reaction* 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.¹⁰ Beberapa penelitian telah menggunakan metode PCR untuk pendeteksian pada tikus. Namun, penelitian-penelitian tersebut masih menggunakan metode endpoint PCR.¹¹⁻¹³ 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.^{14,15}

Primer merupakan salah satu komponen yang berperan penting dalam proses PCR. Primer ialah oligonukleotida yang

memiliki peranan penting dalam proses PCR. Primer bisa didapatkan dengan melakukan desain primer menggunakan *software* bioinformatik. *Software* akan secara otomatis menentukan primer yang layak pada suatu sekuens. Namun, tidak semua hasil pemilihan primer secara otomatis sesuai dengan harapan, sehingga diperlukan campur tangan secara manual.¹⁶ Primer yang baik ialah primer yang spesifik. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Desain secara *in silico* dilakukan untuk mendapatkan suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi.¹⁷ Kespesifikan primer merupakan kunci keberhasilan amplifikasi dengan PCR. Primer spesifik akan menempel pada DNA target untuk selanjutnya diperpanjang menjadi untai DNA baru. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam perancangan primer diantaranya ialah panjang primer, temperatur *melting* (T_m), kandungan GC dan ikatan di ujung 3'. Primer yang baik memiliki panjang antara 18-30 nukleotida. Primer dengan panjang yang kurang dari 18 nukleotida akan membuat penempelan primer menjadi tidak spesifik. Karakteristik kedua yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer

ialah Tm. Primer yang baik memiliki selisih Tm sekitar 5°C antara primer *forward* dan primer *reverse*. Hal ini dimaksudkan untuk memudahkan penentuan suhu *annealing*. Persentase kandungan basa G dan C juga perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi Tm primer.¹⁸

Salah satu gen yang dapat digunakan untuk mendeteksi *Rattus norvegicus* ialah gen Gen Glutathione peroxidase-1 (Gpx1). Gen Gpx1 terdapat di mitokondria dan telah digunakan secara luas untuk studi genetika populasi, filogeni, spesiasi dan sistematika. Oleh karena itu, dalam studi awal ini akan dilakukan desain primer untuk mendeteksi gen Gpx1 pada tikus (*Rattus norvegicus*). Selanjutnya, primer tersebut akan dianalisis secara *in silico* untuk mendapatkan primer yang spesifik.

METODE PENELITIAN

Studi ini dilakukan pada bulan Januari 2023 di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Alam Universitas Negeri Padang.

Alat dan bahan penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah perangkat lunak bioinformatika berupa *Primer BLAST* pada situs *National Center of Biotechnology Information*

(NCBI), *Geneious Prime* dan *IDT Primer Quest*. Bahan yang digunakan ialah sekuens genom Gpx1 *Rattus norvegicus*. Sekuens gen *Rattus norvegicus* glutathione peroxidase 1 (Gpx1) (NM_030826.4) diperoleh dari GenBank NCBI pada situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Pada kotak menu yang tersedia, dipilih kategori *gene*. Selanjutnya pada kotak teks diketik Gpx1 *Rattus norvegicus* untuk memulai pencarian. Sekuens gen Gpx1 *Rattus norvegicus* yang diperoleh selanjutnya diubah menjadi format FASTA.

Desain primer

Format FASTA gen Gpx1 *Rattus norvegicus* yang diperoleh kemudian diolah dengan perangkat lunak *Geneious Prime* untuk mendapatkan kandidat primer. Setelah kandidat primer dan *probe* diperoleh, dilakukan pemilihan primer yang sesuai dengan ketentuan primer yang baik.^{19,20} Kriteria primer ideal meliputi panjang primer, %GC, Tm, interaksi primer (*dimers dan hairpins*), stabilitas primer, *repeats, runs dan false priming*.²¹ Kemudian, primer yang telah dirancang akan diperiksa spesifisitasnya menggunakan *IDT Primer Quest* dan *Primer BLAST* pada situs NCBI secara *in silico* dengan melakukan penyejajaran sekuens primer.

Analisis spesifitas primer secara *in Silico*

Primer yang terpilih dianalisis secara *in silico* untuk menguji spesifisitas primer dan tingkat kesamaan sekuens produk dengan database nukleotida yang terdapat di GenBank NCBI.²² Spesifisitas primer dianalisis secara *in silico* dengan melakukan penyejajaran sekuens primer menggunakan *Primer-BLAST* dan *Primer-Quest* menggunakan *Nucleotide-BLAST* yang terdapat pada situs <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.²³

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen *Gpx1 Rattus norvegicus*

Berdasarkan hasil penelusuran pangkalan data NCBI, hanya diperoleh satu sekuens gen *Gpx1 Rattus norvegicus*. Format FASTA gen *Gpx1 Rattus norvegicus* ditunjukkan pada **Gambar 1**. Gen *Gpx1* pada *Rattus norvegicus* memiliki panjang sekuens 930 bp (*base pair* atau pasangan basa) dan gen ini merupakan bagian dari mRNA. Gen *Gpx1* mengkode *Antioxidant*

Response Element (ARE), yaitu gen-gen penghasil enzim antioksidan. *Antioxidant Response Element* sendiri merupakan gen-gen penghasil enzim antioksidan yang meliputi GPx, GST dan Glutamyl-Cysteine Ligase (GCL).²⁴ Sekuens gen *Gpx1* diperoleh dari pangkalan data NCBI harus diubah ke format FASTA agar dapat digunakan sebagai template dalam desain primer menggunakan perangkat lunak *Geneious Prime*. Format FASTA ialah format *text-based* untuk menunjukkan sekuens nukleotida tanpa penomoran.

Desain primer menggunakan Geneious Primer

Desain primer yang dilakukan terhadap sekuens gen *Gpx1 Rattus norvegicus* (NC_030826) menghasilkan 14 data primer. Berdasarkan seleksi terhadap 14 kandidat primer, kandidat primer dengan nama 448 F dan 612 R dipilih karena memenuhi kriteria primer yang baik.

(Tabel 1)

```
Rattus norvegicus glutathione peroxidase 1 (Gpx1), mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_030826.4
GenBank Graphics
>NM_030826.4 Rattus norvegicus glutathione peroxidase 1 (Gpx1), mRNA
GAAGCCACGTGATCTCAGCCCCATCCAGTTAAAAAGGAGGTGCTGGGCTCTGACTGCGCTACAGCGGATTT
TTGAGTCCAATATCTTCTACAGTATGTCTGCTGCTCGGCTCTCCGGGTTGGCAGTCCACCGTGTATGC
CTTCTCCGCGCCGCCCTGCGGGCGGGGAGCCGCTGAGCCTGGGCTCCCTGCGGGCAAGGTGCTGCTC
ATTGAGAATGTGCGCTCCCTCTGAGGCACACGACCCGGGACTACACCGAAATGAAATGATCTGAGAAGC
GCTCTGGGGCTCTGCGCTGGTGGTCTCGGTTCCCGTGAATCAGTTCGGACATCAGGAGAATGGCAA
GAATGAAGAGATTCTGAATTCCTCAAGTATGTCGACCCGGTGGTGGGTTGAGCCCAACTTACATTG
TTTGAGAAGTGCAGGTGAATGGTGAAGGCTCACCCGCTCTTTACCTTCCGCGAATGCCTTGCCAG
CACCCAGTGACGATCCCACTGCGCTCATGACCCGACCCCAAGTACATCATTTGGTCCCGGTGTGCCGCAA
CGACATTTCTGGAAGTTGAGAAGTTCTGTTAGGTCCAGACGGTGTCCAGTGCAGATACAGCAGG
CGCTTTCGACCATCGACATCGAACCCGATATAGAAGCCCTGCTGTCCAGCAGCCTAGCAACCCCTAAG
GCATTCTGATCTGGGCTTGGTGTGGTGGTGCCTCCGGGGGAGGTTTTTCATGACGGTGTTC
CCTCTAAATTTACATGGAGAACACCTGATTTCCAGAAAAATCCCTCAGATGGGCGTGGTCTCGTCCA
TTCCGGATGCCCTTACGCTAAAGAAAGGCGGTTTTCAACCACTAAGAAATAAGTGTGAATGTCAAGAAC
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Gambar 1. Format FASTA gen *Gpx1 Rattus norvegicus*

Tabel 1. Kandidat primer gen Gpx1 *Rattus norvegicus*

Name	Min	Max	Length	Direction	Sequence (with extension)	%GC	Hairpin T _m	Self Dimer T _m	T _m
633 R	634	653	20	Reverse	TCGATGTCGATGGTGCG AAA	50.0	44.2	0.2	60.1
r1 GPX	619	637	19	Reverse	GAAAGCGCCTGCTGTATC T	52.6	55.5	2.3	57.9
612 R	593	612	20	Reverse	TGGAACACCGTCTGGACC TA	55.0	39.2	None	60.2
r GPX	461	481	21	Reverse	CATTCCGCAGGAAGGTAA AGA	47.6	71.6	13.9	58.0
f1 GPX	452	471	20	Forward	CTCACCCGCTCTTTACCT TC	55.0	None	None	58.0
451 F	451	470	20	Forward	GCTCACCCGCTCTTTACC TT	55.0	None	None	60.0
448 F	448	467	20	Forward	AAGGCTCACCCGCTCTTT AC	55.0	39.2	None	60.0
447 R	428	447	20	Reverse	CTCACCATTCACCTCGCAC T	55.0	None	None	60.0
349 R	330	349	20	Reverse	TGCCATTCTCCTGATGTC CG	55.0	None	None	59.8
f GPX	324	343	20	Forward	TCAGTTCGGACATCAGGA GA	50.0	None	None	57.8
212 F	212	231	20	Forward	TTGAGAATGTCGCGTCCC TC	55.0	None	8.1	60.1
231 R	212	231	20	Reverse	GAGGGACCGGACATTCTC AA	55.0	None	15.9	60.1
124 F	124	143	20	Forward	CAGTCCACCGTGTATGCC TT	55.0	None	None	60.0
9 F	9	28	20	Forward	GTGATCTCAGCCCCATCC AG	60.0	None	None	59.9

Desain primer harus memperhatikan beberapa ketentuan seperti panjang primer, *melting temperature* (TM), persentase basa GC, dan *Self Dimer* TM. Panjang primer yang baik ialah 18-24 nukleotida, karena primer yang terlalu pendek akan kurang spesifik.²⁰ *Melting temperature* (T_m) yang baik berada pada rentang suhu 57-63°C dan persentase basa GC masing-masing sekuens sebesar 40-60%. Semakin kecil *Self Dimer* TM akan semakin baik¹⁹ dan maksimum pengulangan satu basa yang sama secara berurutan adalah 4 basa.²⁵ Hal lain yang

perlu diperhatikan dalam mendesain primer ialah struktur dimer pada primer, jumlah serta posisi basa G dan C pada sekuens primer yang dipilih.²⁶ 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.²⁷ Namun, jumlah basa G dan C yang lebih dari tiga pada lima basa terakhir di ujung 3' primer harus dihindari. Jumlah ikatan antara basa G dan C yang banyak akan mendorong primer untuk membentuk dimer sehingga

akan mempengaruhi konsentrasi DNA hasil amplifikasi.²⁶ Berdasarkan ketentuan tersebut maka dipilih satu pasang primer yaitu kandidat primer dengan nama 448 F memiliki panjang basa 20 nukleotida pada masing-masing sekuens yang terdiri dari 55% GC memiliki Tm ~60,2°C serta *none Self Dimer TM* dan 612 R memiliki panjang basa 20 nukleotida pada masing-masing sekuens yang terdiri dari 55% GC memiliki Tm ~60°C serta *none Self Dimer TM* (Tabel 2).

Pasangan sekuens primer di atas dapat mengamplifikasi panjang produk PCR

sebesar 165 bp dengan primer *forward* dan primer *reverse* yang masing-masing memiliki panjang 20 bp. Nilai %GC pasangan primer ini adalah 60.2% dan 60.0%. Tidak terdapat selisih Tm primer antara primer *forward* dan primer *reverse*. Pasangan primer tidak memiliki interaksi primer seperti dimers dan *hairpins*. Interaksi primer dapat mempengaruhi stabilitas primer karena jika sebuah primer stabil maka dapat menempel pada *template* atau sekuen target. Berdasarkan kriteria primer ideal, pasangan primer ini telah memenuhi persyaratan primer yang baik.

Tabel 2. Kriteria hasil desain pasangan primer

Karakteristik Primer	DNA Fold	Ukuran Amplikon
<p>Name: Binding Region Type: Primer Bind (primer_bind) (Created by primer3) Length: 20 Interval: 1 -> 20 (448 -> 467) %GC: 55.0 Hairpin Tm: 39.2 Self Dimer Tm: None Tm: 60.0 Sequence: AAGGCTCACCCGCTCTTAC</p>		165 bp
<p>Name: Binding Region Type: Primer Bind (primer_bind) (Created by primer3) Length: 20 Interval: 1 -> 20 (612 -> 593) %GC: 55.0 Hairpin Tm: 39.2 Self Dimer Tm: None Tm: 60.2 Sequence: TGGAACACCGTCTGGACCTA</p>		

Analisis spesifisitas primer secara *in Silico*

Hasil penyelarasan sekuens pasangan primer menggunakan *Primer-BLAST* dapat dilihat pada **Gambar 2**. *Primer-BLAST* merupakan alat yang digunakan

untuk mendesain primer yang spesifik dan dapat digunakan juga untuk menganalisis spesifisitas primer terhadap sekuens yang ada di dalam database NCBI.²⁸

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGGTCACCCGCTCTTTAC	Plus	20	448	467	60.04	55.00	3.00	0.00
Reverse primer	TGGAACACCGTCTGGACCTA	Minus	20	612	593	60.18	55.00	4.00	2.00
Product length	165								

Products on intended targets
>NM_030826.4 Rattus norvegicus glutathione peroxidase 1 (Gpx1), mRNA

product length = 165
 Forward primer 1 AAGGTCACCCGCTCTTTAC 20
 Template 448 467

Reverse primer 1 TGGAACACCGTCTGGACCTA 20
 Template 612 593

Products on potentially unintended templates
>XM_039104331.1 PREDICTED: Rattus norvegicus glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (Gpd2), transcript variant X3, mRNA

product length = 2345
 Forward primer 1 AAGGTCACCCGCTCTTTAC 20
 Template 183 GT...TC..G..... 202

Forward primer 1 AAGGTCACCCGCTCTTTAC 20
 Template 2527 .CCA.....G.....C. 2508

Gambar 2. Hasil penyelarasan sekuens pasangan primer gen Gpx1 *Rattus norvegicus*

Penyelarasan menggunakan *Primer-BLAST* memungkinkan melakukan pencarian kesamaan urutan terhadap beberapa pangkalan data yang terdapat di GenBank NCBI. Dari hasil penyelarasan sekuens produk diperoleh *length* 20, *TM* 60, dan *self 3' complementarity* 3.00 untuk *Forward* Primer serta 4.00 untuk *Reverse* Primer. 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.²⁵

KESIMPULAN

Primer *forward* dengan sekuens 5'-AAGGTCACCCGCTCTTTAC-3' dan primer *reverse* dengan sekuens 5'-TGGAACACCGTCTGGACCTA-3' berhasil didesain untuk mengamplifikasi gen Gpx1 pada tikus *Rattus norvegicus* dengan produk berukuran 165 bp. Hasil uji kinerja secara *in silico* menunjukkan primer yang didesain tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi *Rattus norvegicus* secara spesifik. Pasangan primer yang didesain secara *in silico* telah memenuhi kriteria primer yang baik yaitu

diperoleh *length* 20, TM 60, nilai %GC pasangan primer 60.0% dan *self 3' complementarity* 3.00 untuk *Forward* Primer serta 4.00 untuk *Reverse* Primer.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wanandi SI, Dewi S, Paramita R. Ekspresi relatif mRNA HIF-1 α pada jantung, otak dan darah tikus selama induksi hipoksia sistemik. *Makara J Sci.* 2009;13(2):185-8.
2. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med.* 2011;365(6):537-47.
3. Prabhakar NR. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J Physiol (Lond).* 2013;591(9):2245-57.
4. Edhiatmi M, Arozal W, H Purwaningsih E. Efek Kombinasi Ekstrak Etanol *Acalypha indica* dan *Centella asiatica* pada Jantung Tikus Pascahipoksia: Gen Hif-1 α , Troponin I dan Stres Oksidatif. *Jurnal Jamu Indonesia.* 2016;1(2):20-30.
5. Mandia S, Marusin N, Santoso P. Analisis histologis ginjal ikan Asang (*Osteochilus hasseltii*) di Danau Maninjau dan Singkarak, Sumatera Barat. *Jurnal Biologi UNAND.* 2013; 2(3):194-200.
6. Parwata IMAO. Bahan Ajar: Antioksidan. Denpasar: Universitas Udaya. 2016.
7. Adawiah A, Sukandar D, Muawanah A. Aktivitas antioksidan dan kandungan komponen bioaktif sari buah namnam. *Jurnal Kimia Valensi.* 2015;1(2):130-6.
8. Syarifah AS, Supriyanto. Efek timbal (Pb) pada enzim scavenger. Malang: Rena Cipta Mandiri. 2022.
9. Yuniastuti A. Monograf: Dasar molekuler glutation dan perannya sebagai antioksidan. Semarang: FMIPA Unnes. 2016.
10. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol.* 2015;1275:31-56.
11. Nuraini H, Primasari A, Andreas E, Sumantri C. The Use of Cytochrome b Gene as a Specific Marker of the Rat Meat (*Rattus norvegicus*) on Meat and Meat Products. *Med Pet.* 2012;35(1):15-20.
12. Ahamad MNU, Ali MdE, Hossain MAM, Asing A, Sultana S, Jahurul MHA. Multiplex PCR assay discriminates rabbit, rat and squirrel meat in food chain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2017;34(12):2043-57.
13. Cahyadi M, Wibowo T, Pramono A, Abdurrahman ZH. A Novel Multiplex-PCR Assay to Detect Three Non-Halal Meats Contained in Meatball using Mitochondrial 12S rRNA Gene. *Food Sci Anim Resour.* 2020;40(4):628-35.
14. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008;44(5):619-26.
15. Purcell RV, Pearson J, Frizelle FA, Keenan JI. Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Sci Rep.* 2016;6(1):34554.
16. Judelson, H. Guidelines for Designing Primers. [Internet]. 2011. Available from: <http://oomyceteworld.net/protocols/primer%20designing2.pdf>
17. Suryadi PT, Ratnayani K, Yowani SC. Desain Primer untuk Amplifikasi Gen katG Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Kimia.* 2014;8(1):77-82.
18. Sari RN, Dewi RW, Dewi VR, Yowani SC, Yustiantara PS. 2018 Desain Primer untuk Amplifikasi Regio Promoter Gen inh A Isolat P016 Multidrug Resistance *Mycobacterium tuberculosis* dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Farmasi Udayana.* 2018;7(1):34-9.
19. Shen Z, Qu W, Wang W, Lu Y, Wu Y, Li Z, et al. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:143.
20. Hung JH, Weng Z. Designing polymerase chain reaction primers using primer3plus. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(9).
21. Maitriani LKB, Wirajana IN, Yowani SC. Desain primer untuk amplifikasi fragmen gen inhA isolat 134 multidrug resistance tuberculosis (MDR-TB) dengan metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia.* 2015;3(2):89-96.
22. Rodrigues MS, Morelli KA, Jansen AM. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):488.
23. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification.* 2017;14:19-28.
24. Andita, M. F. Pengaruh Pemberian Astaxanthin Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim Glutation Peroksidase Jaringan Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Formaldehid Secara Oral. *Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura.* 2015;5(1):[15p].

25. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012;22(63):e3998.
26. Saraswati H, Seprianto S, Wahyuni FD. Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2019;3(1):33-8.
27. Borah P. Primer designing for PCR. *Science Vision*. 2011;11(3):134-6.
28. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.