



INNOVATIVE: Journal Of Social Science Research

Volume 5 Nomor 4 Tahun 2025 Page 1141-1152

E-ISSN 2807-4238 and P-ISSN 2807-4246

Website: <https://j-innovative.org/index.php/Innovative>

## Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Mutagenesis GLY349→GLU349 pada Gen Glikoprotein Virus Rabies Strain GD-SH-01 sebagai Kandidat Marker Attenuasi

Ni Wayan Antika Sri Devi<sup>1✉</sup>, Sagung Chandra Yowani<sup>2</sup>

Universitas Udayana

Email: [devi.2208551031@student.unud.ac.id](mailto:devi.2208551031@student.unud.ac.id)<sup>1✉</sup>

### Abstrak

Rabies adalah penyakit zoonotik mematikan yang disebabkan oleh virus rabies (RABV) dengan tingkat fatalitas mendekati 100% setelah timbulnya gejala. Mutasi Gly349→Glu349 pada gen glikoprotein (gen G) virus rabies strain GD-SH-01 diketahui berpotensi sebagai penanda molekuler attenuasi dalam pengembangan vaksin hidup tereduksi. Penelitian ini bertujuan untuk merancang pasangan primer secara in silico yang spesifik terhadap mutasi Gly349→Glu349 guna mendukung amplifikasi segmen target menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Desain primer dilakukan menggunakan perangkat lunak Primer3Plus dengan parameter panjang primer 18-28 basa, Tm 55–65 °C, dan kandungan GC 40–60%. Kandidat primer dievaluasi dari aspek termodinamika dan struktur sekunder, serta dianalisis spesifisitasnya menggunakan PrimerBLAST berbasis sekuens hasil konstruksi mutagenesis. Lima kandidat pasangan primer dihasilkan dengan pasangan primer ketiga dipilih sebagai primer terbaik menghasilkan produk PCR sepanjang 175 bp dengan mutasi Gly349→Glu349 terletak di tengah amplicon dan menunjukkan spesifisitas terhadap sekuens target. Pasangan primer yang dirancang secara in silico menunjukkan potensi dalam amplifikasi spesifik terhadap mutasi Gly349→Glu349 pada gen glikoprotein virus rabies. Rancangan ini dapat dijadikan dasar dalam studi molekuler lanjutan serta pengembangan metode analisis genetik dan vaksin rabies berbasis teknologi rekayasa genetik.

Kata Kunci: *Virus Rabies, Strain GD-SH-01, Mutasi Gly349→Glu349, Primer, Desain In Silico*

## Abstract

Rabies is a fatal zoonotic disease caused by the rabies virus (RABV) with a case mortality rate almost 100% after the onset of symptoms. The Gly349→Glu349 mutation in the glycoprotein gene (G gene) of the rabies virus strain GD-SH-01 has been identified as a potential molecular marker for attenuation in the development of live attenuated vaccines. This study aims to design *in silico* primer pairs specific to the Gly349→Glu349 mutation to enable amplification of the target segment using Polymerase Chain Reaction (PCR). Primer design was carried out using the Primer3Plus software with parameters of primer length between 18–28 bases, melting temperature ( $T_m$ ) of 55–65 °C, and GC content of 40–60%. Candidate primers were evaluated based on thermodynamic properties and secondary structure formation, and their specificity was analyzed using PrimerBLAST based on the mutated sequence. Five candidate primer pairs were generated, among which the third pair was selected as the best, producing a 175 bp PCR product with the Gly349→Glu349 mutation located at the center of the amplicon and demonstrating high specificity to the target sequence. The designed *in silico* primer pair shows strong potential for specific amplification of the Gly349→Glu349 mutation in the rabies virus glycoprotein gene. This design provides a scientific foundation for further molecular studies and the development of genetic analysis methods and rabies vaccines based on genetic engineering technology.

Keywords: *Rabies Virus, GD-SH-01 Strain, Gly349→Glu349 Mutation, Primer, In Silico Design*

## PENDAHULUAN

Rabies merupakan penyakit zoonotik yang menyerang sistem saraf pusat dan masih menjadi permasalahan kesehatan global yang serius (Singh *et al.*, 2017). Tingkat fatalitas penyakit ini mendekati 100% setelah munculnya gejala klinis, sehingga rabies diklasifikasikan sebagai salah satu penyakit paling mematikan yang ditularkan dari hewan ke manusia. Penyakit ini disebabkan oleh virus rabies (RABV) dari genus *Lyssavirus* dalam famili *Rhabdoviridae*. Secara statistik 98% kasus rabies ditularkan melalui gigitan anjing, sedangkan 2% lainnya disebabkan oleh gigitan kucing dan kera (Durrant *et al.*, 2023; Singh *et al.*, 2017). Laporan dari *World Health of Organization* (WHO) tahun 2024 menyebutkan bahwa terdapat sekitar 59.000 kematian karena rabies setiap tahun secara global dengan mayoritas kasus terjadi di Asia dan Afrika dan Indonesia sendiri termasuk dalam daftar negara endemis rabies dengan 26 dari 34 provinsi dilaporkan sebagai wilayah tertular (Muhinda *et al.*, 2025). Berdasarkan data bulanan zoonosis tahun 2024, terdapat 185,359 kasus gigitan hewan penyebab rabies (HPR) dan 122 kematian akibat rabies pada manusia (Durrant *et al.*, 2023). Sementara itu, sejak Januari hingga 7 Maret 2025, sudah dilaporkan 13,453 kasus gigitan HPR dan 25 kematian akibat rabies (Kemenkes RI, 2025). Tingginya angka kematian serta penyebaran luas virus rabies menggarisbawahi pentingnya dukungan

data molekuler yang akurat untuk memahami karakteristik genetik virus khususnya pada tahap pra-gejala yang sering luput terdeteksi.

Analisis molekuler menjadi sangat penting dalam studi rabies karena sifat progresif penyakit ini yang cepat dan periode inkubasinya yang sering kali asimtomatik. Salah satu metode yang umum digunakan dalam kajian molekuler adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang memungkinkan amplifikasi sekuens target dengan sensitivitas tinggi dan waktu proses yang lebih cepat (Schreiber *and* Fachinetto, 2024). Virus RABV memiliki genom RNA untai tunggal negatif sepanjang  $\pm 12$  kb yang menyandi lima protein struktural yaitu nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), matriks (M), glikoprotein (G), dan RNA polimerase (L) (Zhang *et al.*, 2020). Glikoprotein G yang berada di permukaan virion dan memainkan peran kunci dalam pengenalan reseptor sel inang, fusi membran, transmisi transsinaptik, serta penginduksian antibodi penetralisasi virus (Al-Masoud *et al.*, 2023). Berdasarkan hal tersebut, gen glikoprotein (gen G) pada virus rabies dapat menjadi salah satu target utama dalam diagnostik molekuler (Zhang *et al.*, 2020). Gen ini bersifat variabel dan rentan mengalami mutasi yang dapat memengaruhi virulensi virus maupun efektivitas vaksin (Al-Masoud *et al.*, 2023). Salah satu mutasi yang telah teridentifikasi pada strain rabies GD-SH-01 adalah substitusi asam amino glisin (Gly) menjadi glutamat (Glu) pada posisi 349 (Gly349→Glu349) (Luo *et al.*, 2012). Berdasarkan hal tersebut, gen glikoprotein (gen G) menjadi salah satu target penting dalam kajian molekuler, terutama dalam penelitian yang berkaitan dengan virulensi dan imunogenisitas virus.

Gen G diketahui bersifat variabel dan rentan mengalami mutasi yang dapat memengaruhi sifat biologis virus. Salah satu mutasi yang telah dikonstruksi secara mutagenesis pada strain rabies GD-SH-01 dalam studi eksperimental adalah substitusi asam amino glisin (Gly) menjadi glutamat (Glu) pada posisi 349 (Gly349→Glu349) (Zhang *et al.*, 2020). Berdasarkan karakteristik biologis yang ditunjukkan oleh mutasi ini, gen glikoprotein (gen G) menjadi salah satu target penting dalam kajian molekuler, terutama yang berkaitan dengan virulensi dan imunogenisitas virus. Penelitian yang dilakukan oleh Luo *et al.* (2012) menunjukkan bahwa mutasi ini justru dapat menurunkan virulensi virus rabies secara signifikan melalui peningkatan ekspresi interferon- $\alpha$  di otak, peningkatan respons antibodi netralisasi, dan peningkatan permeabilitas sawar darah otak. Oleh karena itu, temuan ini menempatkan Gly349→Glu349 sebagai mutasi dengan potensi strategis untuk dijadikan marker molekuler attenuasi, khususnya dalam pengembangan vaksin hidup tereduksi (*live attenuated rabies vaccine*) (Lebrun *et al.*, 2017). Marker attenuatif Gly349→Glu349 dapat dimanfaatkan dalam berbagai lini riset dan teknologi biomedis. Mutasi ini berpotensi

digunakan untuk rekayasa galur vaksin yang lebih aman namun tetap imunogenik, serta untuk pengembangan metode analisis molekuler terhadap konstruksi genetik buatan yang bersifat attenuatif (Hu *et al.*, 2017). Oleh karena itu, perlu dilakukan desain primer yang mampu mengamplifikasi secara spesifik sekuens mutasi ini sebagai langkah awal dalam eksplorasi dan pemanfaatan mutasi Gly349→Glu349 secara bioteknologis (Katz *et al.*, 2017; Paryati *et al.*, 2024).

Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini bertujuan untuk merancang primer secara *in silico* yang spesifik terhadap mutasi Gly349→Glu349 pada gen glikoprotein virus rabies strain GD-SH-01. Primer yang dirancang difokuskan untuk keperluan amplifikasi segmen gen target melalui metode PCR guna memungkinkan studi lebih lanjut terhadap karakteristik molekuler mutasi tersebut. Keberhasilan rancangan ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan sistem analisis genetik yang mendukung formulasi vaksin rabies hidup tereduksi serta pemantauan respons imunologis dari mutasi attenuatif (Palupi *and* Fadly, 2024).

#### METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan secara *in silico* untuk merancang primer yang dapat mengamplifikasi segmen gen glikoprotein virus rabies strain GD-SH-01 hasil konstruksi mutagenesis dengan substitusi Gly349→Glu349. Urutan nukleotida gen G strain GD-SH-01 diperoleh dari database GenBank NCBI (nomor akses JX088694.1) dan disimpan dalam format FASTA. Mutasi Gly349→Glu349 disisipkan menggunakan *SnapGene* pada posisi kodon ke-349 (basa ke-1045-1047) sesuai laporan Luo *et al.* (2012), dan sekuens yang telah dimutasi kemudian digunakan sebagai templat untuk desain primer dan dimasukkan ke dalam perangkat lunak *Primer3Plus* (<https://primer3plus.com>). Parameter desain ditetapkan dengan panjang primer 18-28 basa, Tm 55-65 °C, dan kandungan GC 40-60% (Kusnadi dkk., 2022).

Primer yang dihasilkan dievaluasi untuk memastikan tidak terbentuknya struktur sekunder seperti *hairpin*, *self-dimer*, atau *cross-dimer* yang dapat mengganggu efisiensi reaksi amplifikasi. Pasangan primer terbaik kemudian diuji spesifisitasnya melalui *Primer-BLAST* (NCBI) dengan memasukkan sekuens mutan sebagai templat. Produk amplifikasi divisualisasikan untuk memastikan bahwa lokasi mutasi Gly349→Glu349 berada dalam wilayah amplifikasi dengan preferensi posisi mendekati pusat ampikon. Proses simulasi bertujuan untuk memastikan bahwa pasangan primer hanya mengamplifikasi fragmen gen

G hasil konstruksi mutagenesis yang mengandung mutasi Gly349→Glu349 dan tidak menempel pada sekuens non-target.

FASTA ▾

### Rabies virus strain GD-SH-01, complete genome

GenBank: JX088694.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>JX088694.1:3316-4890 Rabies virus strain GD-SH-01, complete genome
ATGGTTCCTCAAGCCCTTCTGTTTGTACCCCTCTGGCCGTTCCATTGTGTTTGGGAAATCCCCATTT
ACACGATACCAGACAAACTCGGTCCCTGGAGTCCCATTTGATATACATCATCTCAGCTGTCCGAATAATTT
GGTTGTGGAGGATGAAGGATGTACCAATCTGTCAAGATTTTCATACATGGAACCTAAAGTAGGATACATT
TCAGCCATAAAGGTGAACGGATTCACTTGTACGGGTGGTGGACGGAAGCAGAAACCTACACCAACTTTG
TTGGCTATGTCACCACCGCTTTAAGAGAAAGCACTTTCGACCAACACCGGATGCGTGAGATCCGCATA
CAATTGGAAGATGGTGGTGACCCAGATACGAAGAGTCTCTGCACAATCCCTATCCTGATTATCATTGG
CTCCGGACTGTAAAAACACCAAAGAGTCTTTGTATCATATCTCCAAGTGGCAGATCTAGATCCGT
ACGATAAATCCCTTATTGAGAGTTTTCTAGAGGAAAATGCTCAGGAATAACGGTGTCTTACCTA
CTGCTCTACTAACCATGACTACACCATCTGGATGCTGAGAATCCAGACTGGGAACCTCTTGTGATATT
TTCACCAACAGCAGAGGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGCAAGACCTGTGGATTGTAGATGAGAGAGGCT
TGTACAAATCTTAAAGGAGCATGCAAACTGAAGCTGTGTGGGTTCTTGGACTTAGACTTATGGATGG
AACATGGGTGCAATTCAGACATCAGACGAGACCAAGTGGTGCCTCTGACCAGCTAGTGAATCTACAT
GACTTTCATTCCGATGAGATTGAACATCTTGTGTGGAGGAGTTGGTCAAGAAAAGGGAAGAGTGTCTAG
ATGCACTGGAGTCCATCATGACCACCAAGTCCGTGAGTTTCCGACGTCTCAGTCACTTGAGGAAACTTGT
GCCTGGATTCGGAAAAGCATACACCATATTCAATAAGACCTTGTGGAGGCTGACGCTCACTACAAATCG
GTTCCGACTTGGAAACGAGATCATCCCTCTAAAGGGTGTGGAGGTTGGAGGCAGATGTCATCCCATG
TGAACGGGGTGTCTTCAATGGTATTATCTTAGGCCCTGACGGCCATGTCTTGATCCCGGAAATGCAGTC
ATCTCTCCTTCAGCAGCATATGGAGTTGTTGGAATCCTCGGTATCCCTTAATGCATCCTTTGGCAGAT
CCATCAACGGTTTTTAAAGACGGTGACGAGGCGGAGGATTTGTGGAGTTCACTTCCAGATGTGCATA
AGCAGGTCTCAGGGTTCGATCTCGTCTCCAAGTGGGGGAAGTATGTGTTGATGAGCGCAGGCAATTT
GACTGCACTGATGTTGATGATTTTCTTGTGACGTGTTGCCGAAGGACCAATAGAGCAGAATCAATACAA
CATAGTCTTGGAGAGACAGGGAGAAAGTGTCCGTAACCTCCCAAAACGGGAGGGTTCATATCTTCATGGG
AGTCATACAAAAGCGGAGGTGAGACCAAGCTGTA
```

Gambar 1. Sekuens Gen Glikoprotein Virus Rabies Strain GD-SH-01

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Desain Primer Menggunakan Primer3Plus

Perancangan primer merupakan tahap penting dalam amplifikasi segmen DNA. Proses ini dilakukan secara in siliko berbasis ilmu bioinformatika. Primer berperan dalam reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yakni pada proses hibridisasi dengan DNA templat dan menentukan daerah yang akan diperbanyak (Tanabe *et al.*, 2019). Primer juga menjadi tempat penempelan DNA polimerase saat proses amplifikasi berlangsung (van Pelt-Verkuil *and* te Witt, 2019). Oleh karena itu, urutan primer sangat mempengaruhi tingkat spesifisitas dan sensitivitas dari reaksi PCR yang dilakukan. Desain primer yang dilakukan terhadap sekuens gen glikoprotein virus rabies strain GD-SH-01 menghasilkan lima kandidat pasangan primer (Tabel 1). Berdasarkan seleksi terhadap lima kandidat pasangan primer, dipilih kandidat primer 3 karena sesuai memenuhi kriteria primer yang baik.

Tabel 1. Kandidat Primer Hasil Desain Menggunakan Primer3Plus untuk Mutasi Gly349→Glu349

Sekuens (5' → 3')	Karakteristik				
	Panjang Basa (nt)	Tm (oC)	GC (%)	Self 3' complementarity	Produk PCR (bp)
Kandidat Primer 1					
Forward GGGGTTCTTGGACTTAGACT	20	54,9°C	50,0 %	3,0	163
Reverse ACTCTCCCTTTTCTTGACC	20	55,0 °C	45,0 %	0,0	
Kandidat Primer 2					
Forward ACTTTGTTGGCTATGTCACC	20	55,1°C	45,0 %	2,0	275
Reverse GCCACACTTGGAGATATGAT	20	55,0°C	45,0 %	3,0	
Kandidat Primer 3					
Forward ACGAAGAGTCTCTGCACAAT	20	55,0°C	45,0 %	2,0	175
Reverse GAAGACACCGTTATTCCTGA	20	55,2°C	45,0 %	2,0	
Kandidat Primer 4					
Forward GGTCAAGAAAAGGGAAGAGT	20	55,0°C	45,0 %	1,0	220
Reverse CTCTCCA ACTCTCAAACACC	20	54,8°C	50,0 %	0,0	
Kandidat Primer 5					
Forward CGGTGTCTTCTACCTACTGC	20	55,1°C	55,0 %	2,0	233
Reverse CCATGTTCCATCCATAAGTC	20	55,3°C	45,0 %	1,0	

Salah satu perangkat bantu yang digunakan dalam perancangan primer adalah *Primer3Plus*. Aplikasi ini menghasilkan data primer berupa urutan basa, panjang, titik leleh (*melting temperature*), persentase kandungan GC, serta panjang amplicon. Beberapa parameter yang harus diperhatikan dalam desain primer meliputi panjang primer, nilai Tm, kandungan GC, serta kemungkinan pembentukan struktur sekunder seperti *self-dimer* atau

hairpin (Hung *and* Weng, 2016). Kandidat primer dengan panjang antara 18-28 basa diketahui memberikan hasil amplifikasi yang paling optimal (Zaid *et al.*, 2019). Panjang primer yang terlalu panjang dapat menurunkan spesifisitasnya dan mengurangi efisiensi amplifikasi karena proses pemanjangan DNA akan memakan waktu lebih lama (Kusnadi dkk., 2022). Selain itu, primer yang terlalu panjang juga menyebabkan biaya sintesis yang lebih besar. Kandungan basa guanin (G) dan sitosin (C) GC (%) sebaiknya berada pada rentang 40-60%. Jika nilainya terlalu rendah, primer akan sulit menempel secara selektif pada target. Sebaliknya, jika kandungan GC terlalu tinggi, hasil amplifikasi berisiko menjadi tidak spesifik (Dewi dkk., 2018; Safitri dkk., 2018). Nilai titik leleh ( $T_m$ ) adalah suhu saat 50% heliks ganda DNA terpisah, sehingga memungkinkan primer untuk masuk dan menempel pada target. Nilai  $T_m$  yang ideal untuk primer berkisar antara 50-65 °C. Rentang ini perlu dijaga karena sangat memengaruhi suhu annealing dalam PCR. Jika  $T_m$  terlalu tinggi (>65 °C), suhu *annealing* menjadi kurang efektif dan dapat menghambat proses amplifikasi. Sebaliknya, jika terlalu rendah, primer dapat dengan mudah menempel di lokasi yang tidak tepat, dan hal ini berdampak pada hasil amplifikasi yang tidak spesifik (Yadav *et al.*, 2025).

Hal penting lain yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer untuk menghindari terbentuknya struktur dimer adalah jumlah serta posisi ikatan basa G-C. Primer yang memiliki terlalu banyak pasangan basa G-C cenderung lebih mudah membentuk struktur dimer antar-primer dibandingkan berikatan dengan DNA target (Raso *and* Biassoni, 2014; Saraswati dkk., 2019). Selain itu, keberadaan ikatan G-C dalam jumlah besar juga dapat menurunkan konsentrasi efektif DNA yang tersedia untuk proses amplifikasi. Posisi ikatan G-C jika berada di dekat ujung 3' dapat meningkatkan kecenderungan terbentuknya dimer dan dapat mengganggu efisiensi proses PCR. Oleh karena itu, primer yang ideal adalah primer dengan jumlah ikatan G-C yang seminimal mungkin dan distribusinya tidak terkonsentrasi di ujung 3' (Fakih dkk., 2021).

Lima kandidat primer (Tabel 1) yang dihasilkan lalu dievaluasi berdasarkan kriteria. Seluruh primer memiliki panjang 20 basa, dengan nilai  $T_m$  yang cukup seimbang antara *forward* dan *reverse* (berkisar 54,8-55,3 °C), serta persentase GC dalam rentang ideal 45-55% yang mendukung kestabilan dan spesifisitas primer selama proses PCR. Nilai *self 3'-complementarity* menunjukkan menunjukkan nilai relatif rendah yang berarti memiliki risiko paling rendah membentuk struktur sekunder yang dapat mengganggu amplifikasi, terutama karena primer *reverse*-nya memiliki nilai 0,0 (Safitri dkk., 2018). Berdasarkan parameter-parameter tersebut, kandidat primer nomor 3 dipilih sebagai pasangan primer terbaik karena menunjukkan keseimbangan antara  $T_m$  *forward* dan *reverse*, GC% yang

stabil, serta produk PCR sepanjang 175 bp yang cukup ideal untuk menyertakan posisi mutasi Gly349→Glu349 di tengah-tengah amplicon. Selain itu, struktur termodinamikanya juga tergolong stabil dengan nilai *self complementarity* 2,0 baik pada *forward* maupun *reverse* yang menandakan rendahnya potensi pembentukan struktur sekunder internal (Sihotang dkk., 2021).

### Analisis Spesifisitas Primer Secara *in Silico*

Kriteria paling penting yang harus dimiliki oleh primer adalah spesifik terhadap target. 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). Berdasarkan hasil analisis spesifitas sekuens dari pasangan primer melalui *Primer-BLAST* diperoleh hasil seperti yang disajikan pada Tabel 2. *Primer-BLAST* umumnya digunakan untuk merancang primer yang bersifat spesifik, namun alat ini juga dapat dimanfaatkan untuk menganalisis tingkat spesifisitas primer dengan membandingkannya terhadap sekuens yang tersedia dalam basis data NCBI (Abdullah dkk., 2019).

<b>Primer pair 1</b>			
		<b>Sequence (5'-&gt;3')</b>	
<b>Forward primer</b>		ACGAAGAGTCTCTGCACAAT	
<b>Reverse primer</b>		GAAGACACCGTTATTCCTGA	
<b>Products on target templates</b>			
>Mutant_Gly349Glu_GD-SH-01			
product length = 175			
Forward primer	1	ACGAAGAGTCTCTGCACAAT	20
Template	1032	.....	1051
Reverse primer	1	GAAGACACCGTTATTCCTGA	20
Template	1194	.....	1175

Gambar 2. Hasil Analisis Spesifitas Primer dengan *PrimerBLAST*

Analisis spesifisitas primer dilakukan menggunakan *PrimerBLAST* dengan memasukkan sekuens gen G virus rabies hasil konstruksi mutagenesis sebagai templat. Hasil penyelarasan menunjukkan bahwa kandidat primer nomor 3 secara spesifik menempel pada segmen target gen glikoprotein dan tidak menunjukkan kecenderungan menempel pada sekuens lain di basis data. Hasil simulasi juga menunjukkan bahwa amplicon yang dihasilkan memiliki panjang 175 bp dengan posisi mutasi Gly349→Glu349 berada dalam wilayah amplifikasi, bahkan berada relatif dekat dengan bagian tengah amplicon. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi dapat teramplifikasi dan terdeteksi atau dianalisis lebih lanjut dengan presisi tinggi. Tidak ditemukan hasil amplifikasi pada sekuens

non-target, sehingga primer ini dinyatakan memiliki spesifisitas tinggi terhadap gen target yang telah dimutasi secara in siliko (Kusnadi dkk., 2022). Hasil rancangan desain primer secara in siliko ini berpotensi mendukung keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan PCR secara in vivo sebagai langkah awal dalam studi molekuler untuk identifikasi mutasi Gly349→Glu349 pada gen glikoprotein virus rabies strain GD-SH-01. Rancangan ini diharapkan dapat digunakan pada penelitian lanjutan yang berkaitan dengan pemantauan varian virus dan pengembangan kandidat vaksin rabies hidup tereduksi.

#### SIMPULAN

Primer *forward* dengan sekuens 5'-ACGAAGAGTCTCTGCACAAT-3', primer *reverse* dengan sekuens 5'-GAAGACACCGTTATTCCTGA-3' untuk mengamplifikasi segmen gen glikoprotein virus rabies strain GD-SH-01 dengan produk PCR berukuran 175 bp. Hasil uji kinerja secara in siliko menunjukkan bahwa pasangan primer ini dapat digunakan secara spesifik untuk mengamplifikasi wilayah yang mengandung mutasi Gly349→Glu349, sehingga berpotensi diaplikasikan dalam analisis genetik dan karakterisasi varian virus rabies. Upaya untuk membuktikan bahwa pasangan primer tersebut dapat digunakan dalam amplifikasi mutasi Gly349→Glu349 pada gen glikoprotein virus rabies perlu divalidasi lebih lanjut melalui eksperimen di laboratorium. Namun demikian, pasangan primer yang telah dirancang dan dianalisis secara komprehensif melalui pendekatan in siliko ini memberikan dasar yang kuat dalam mendukung pengembangan metode amplifikasi spesifik berbasis *real-time* PCR untuk studi genetik dan karakterisasi varian virus rabies.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., Sativa, H. A., Nurhayati, T., & Nurilmala, M. (2019). Pemanfaatan DNA barcoding untuk ketertelusuran label berbagai produk olahan ikan berbasis surimi komersial. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(3), 508-519.
- Al-Masoud, I. T. E. A. J., Charlton, F. W., Finke, S., Barr, J. N., & Mankouri, J. (2023). Internalization of rabies virus glycoprotein differs between pathogenic and attenuated virus strains. *Journal of General Virology*, 104(12).
- Dewi, R. W., Dewi, V. R., Yowani, S. C., & Yustiantara, P. S. (2018). Desain Primer untuk Amplifikasi Regio Promoter Gen inh A Isolat P016 Multidrug Resistance Mycobacterium tuberculosis dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(1), 34-39.

- Durrant, R., Cobbold, C. A., Brunker, K., Campbell, K., Dushoff, J., Ferguson, E. A., ... & Hampson, K. (2024). Examining the molecular clock hypothesis for the contemporary evolution of the rabies virus. *PLoS Pathogens*, 20(11), e1012740.
- Fakih, T. M., Wijaya, S., & Priani, S. E. (2021). Desain primer gen 12s srna dari dna mitokondria babi (sus scrofa) secara in silico sebagai kandidat primer dalam analisis molekuler kehalalan produk. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 8(3):316–322.
- Gilbert, M., Sulikhan, N., Uphyrkina, O., Гончарук, M. C., Kerley, L. L., Hernandez-Castro, L. E., ... & Cleaveland, S. (2020). Distemper, extinction, and vaccination of the amur tiger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(50), 31954-31962.
- Hu, D. J. J., Xia, X., Yang, M., Song, Y., Han, Q., Chen, Q., ... & Zhang, J. (2017). Prokaryotic expression and monoclonal antibody preparation of rabies virus phosphoprotein. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 10(8).
- Hung, J. H., & Weng, Z. (2016). Designing polymerase chain reaction primers using Primer3Plus. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(9), 821–826.
- Katz, I. S. S., Guedes, F., Fernandes, E. R., & Silva, S. d. R. (2017). Immunological aspects of rabies: a literature review. *Archives of Virology*, 162(11), 3251-3268.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2025). *Surat Edaran Nomor HK.02.02/C/508/2025 tentang Kewaspadaan terhadap Kasus Rabies*. Jakarta: Direktorat Jenderal Penanggulangan Penyakit.
- Kusnadi, J., Arumingtyas, E. L., & Hakiki, H. M. (2022). *Aplikasi Teknik PCR untuk Autentikasi Halal*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Lebrun, A., Garcia, S., Li, J., Kean, R., & Hooper, D. C. (2017). Protection against cns-targeted rabies virus infection is dependent upon type-1 immune mechanisms induced by live-attenuated rabies vaccines. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2(3), 22.
- Luo, Y., Zhang, Y., Liu, X., Yang, Y., Yang, X., Zhang, D., ... & Guo, X. (2012). Complete genome sequence of a highly virulent rabies virus isolated from a rabid pig in south China. *J. Virol.* 86, 12454-12455.
- Muhinda, O. V., Vakuru, C. T., Tomoh, P., Lazarus, D. D., Ibrahim, H. I., Usman, J. G., & Kwaghe, A. V. (2025). A cross-sectional study on antirabies vaccination exercise commemorating the World Rabies Day Celebration 2024 in Plateau State, Nigeria: breaking rabies boundaries. *PAMJ-One Health*, 16(6), 1-14.

- Palupi, S. Y. and Fadly, W. (2024). Analisis respon siswa terhadap pengoptimalan alat peraga pada mata pelajaran ipa kelas v di sdn koripan bungkal ponorogo. *AL-THIFL: Jurnal Ilmiah Pendidikan Guru Madrasah Ibtidaiyah*, 3(2), 450-467.
- Paryati, S. P. Y., Nugroho, D., & Hasan, K. (2024). Electrostatic Mapping of Rabies Anti-idiotype Antibody Compared to Rabies Virus Glycoprotein. *KnE Life Sciences*, 111-122.
- Raso, A., & Biassoni, R. (2014). *Twenty years of qPCR: a mature technology?*. Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols, 1-3.
- Safitri, T. A., Patty, D. N., & Saraswati, H. (2018). Gen L1 HPV 16 dan 18 Sebagai Dasar Dalam Desain Primer untuk Deteksi Kanker Leher Rahim dengan in-House Multiplex PCR. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(2), 67-71.
- 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.
- Schreiber, M. d. S. and Fachinetto, J. M. (2024). Phylogenetic relationship between rabies virus (rabies lyssavirus) variants from two different host species. *Veterinária E Zootecnia*, 31, 1-7.
- 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.
- Singh, R., Singh, K., Cherian, S., Saminathan, M., Kapoor, S., Reddy, G., ... & Dhama, K. (2017). Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37(1), 212-251.
- Tanabe, A. S., Nagai, S., Hongo, Y., Yasuike, M., Nakamura, Y., Fujiwara, A., & Katakura, S. (2019). Primer design, evaluation of primer universality, and estimation of identification power of amplicon sequences in silico. *Marine Metagenomics: Technological Aspects and Applications*, 21-36.
- van Pelt-Verkuil, E., & te Witt, R. (2019). *Primers and Probes*. Molecular Diagnostics: Part 1: Technical Backgrounds and Quality Aspects, 51-95.
- Yadav, S., Kumari, P., Sharma, S., Kalra, V., Sharma, M., & Batra, B. (2025). *Advanced Molecular Techniques in the Identification of Phytopathogenic Fungi*. In *Molecular and Biotechnological Tools for Plant Disease Management* (pp. 287-317). Springer, Singapore.

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 1-11.
- Zaid, T., Ereqat, S., Nasereddin, A., Al - Jawabreh, A., Abdelkader, A., & Abdeen, Z. (2019). Molecular characterization of Anaplasma and Ehrlichia in ixodid ticks and reservoir hosts from Palestine: a pilot survey. *Veterinary Medicine and Science*, 5(2), 230-242.