



INNOVATIVE: Journal Of Social Science Research

Volume 5 Nomor 4 Tahun 2025 Page 12037-12046

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

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

Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen Pre-S2 Virus Hepatitis B

Ni Putu Ayu Tirtawati^{1✉}, Sagung Chandra Yowani²

Universitas Udayana

Email: ayutirtaputu@gmail.com^{1✉}

Abstrak

Hepatitis B merupakan penyakit infeksi serius yang disebabkan oleh virus Hepatitis B (HBV), yang dapat berkembang menjadi sirosis hingga karsinoma hepatoseluler. Deteksi dini infeksi HBV sangat penting untuk mencegah progresi penyakit, namun wilayah gen Pre-S2 sebagai target diagnostik masih jarang dikaji. Gen ini memiliki peran penting dalam infektivitas virus, replikasi, serta respons imun, dan mutasinya diketahui berkontribusi terhadap infeksi tersembunyi dan patogenesis kanker hati. Penelitian ini bertujuan untuk merancang pasangan primer secara *in silico* yang spesifik terhadap gen Pre-S2 HBV menggunakan pendekatan bioinformatika. Rancangan dilakukan dengan menggunakan Primer3Plus berdasarkan sekuens genom HBV dari GenBank (Accession Number AB246345.1), dan dievaluasi melalui parameter fisikokimia seperti panjang, suhu leleh (T_m), kandungan GC, serta potensi pembentukan struktur sekunder. Kandidat terbaik kemudian diuji spesifisitasnya menggunakan Primer-BLAST terhadap berbagai isolat HBV. Hasil menunjukkan bahwa pasangan primer forward 5'-TTCCTCTTCATCCTGCTGCT-3' dan reverse 5'-AGTTTCCGTCCGAAGGTTTT-3' mampu mengamplifikasi gen Pre-S2 dengan panjang produk PCR 193 bp dan menunjukkan spesifisitas tinggi terhadap genom HBV. Temuan ini menunjukkan bahwa pendekatan *in silico* efektif dalam merancang primer yang dapat digunakan dalam deteksi molekuler gen Pre-S2 HBV, dan berpotensi untuk diaplikasikan dalam diagnosis, penelitian mutasi, serta pengembangan strategi pencegahan.

Kata Kunci: *Hepatitis B, gen Pre-S2, primer PCR, in silico, Primer3Plus, Primer-BLAST*

Abstract

Hepatitis B is a serious infectious disease caused by the Hepatitis B virus (HBV), which can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Early detection of HBV infection is crucial to prevent disease progression, but the Pre-S2 gene region as a diagnostic target remains understudied. This gene plays a crucial role in viral infectivity, replication, and immune response, and its mutations are known to contribute to latent infection and the pathogenesis of liver cancer. This study aimed to design *in silico* primer pairs specific to the HBV Pre-S2 gene using a bioinformatics approach. The design was performed using Primer3Plus based on the HBV genome sequence from GenBank (Accession Number AB246345.1), and evaluated through physicochemical parameters such as length, melting temperature (T_m), GC content, and potential for secondary structure formation. The best candidates were then tested for specificity using Primer-BLAST against various HBV isolates. The results showed that the forward primer pair 5'-TTCCTCTTCATCCTGCTGCT-3' and reverse primer pair 5'-AGTTTCCGTCCGAAGGTTTT-3' were able to amplify the Pre-S2 gene with a PCR product length of 193 bp and exhibited high specificity for the HBV genome. These findings demonstrate the effectiveness of the *in silico* approach in designing primers for molecular detection of the HBV Pre-S2 gene and its potential applications in diagnosis, mutation research, and the development of prevention strategies.

Keywords: *Hepatitis B, Pre-S2 gene, PCR primers, in silico, Primer3Plus, Primer-BLAST*

PENDAHULUAN

Hepatitis B merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus Hepatitis B (HBV), yang menyerang hati dan dapat berkembang menjadi infeksi kronis dengan konsekuensi serius seperti sirosis dan karsinoma hepatoseluler (HCC) (Annisa, 2019). Penularan virus ini dapat terjadi melalui darah dan cairan tubuh, air liur, cairan serebrospinalis, pleural, peritena, cairan amniotik, cairan vagina, semen, dan cairan tubuh lainnya. Selain itu, penularan virus ini dapat terjadi dari ibu ke anak saat persalinan, hubungan seksual, dan penggunaan jarum suntik tidak steril (Nadia dan Anggina, 2021). HBV bersifat 50 hingga 100 kali lebih infeksius dibandingkan dengan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), yang merupakan virus penyebab penyakit *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) (Suratno dan Sartika, 2020). HBV termasuk ke dalam famili Hepadnaviridae dan memiliki genom DNA heliks ganda melingkar dengan panjang sekitar 3020-3320 bp (Lestari dan Kafesa, 2024). Infeksi HBV ini merupakan masalah kesehatan global, dengan konsekuensi klinis dan ekonomi yang signifikan.

Menurut World Health Organization (WHO), sekitar 254 juta orang di dunia hidup dengan infeksi hepatitis B kronis dan sekitar 1,1 juta orang meninggal pada tahun 2022 akibat HBV. Indonesia diperkirakan memiliki 17,5 juta kasus hepatitis B pada tahun 2022, yang menjadikannya kontributor ketiga terbesar secara global setelah Tiongkok dan India.

Selain itu, Indonesia termasuk dalam daftar 10 negara dengan beban tertinggi hepatitis B dan C secara gabungan, yang mencapai hampir dua pertiga dari total beban global. Namun, diagnosis dan pengobatan masih sangat rendah, yakni diagnosis hanya mencakup 3% dan pengobatan 0,1% dari total kasus hepatitis B di Indonesia (WHO, 2024). Penyakit ini sering kali tidak menunjukkan gejala pada fase awal sehingga diagnosis dini menjadi tantangan sangat penting dalam mencegah progresi penyakit ke tahap kronis (Aini dan Susiloningsih, 2013).

Salah satu gen penting dalam genom HBV adalah gen Pre-S₂, yang merupakan bagian dari dalam *open reading frame* (ORF) PreS/S pada genom HBV yang menyandi protein amplop virus, yaitu protein L (*large*), M (*middle*), dan S (*small*). Ketiganya merupakan variasi struktur dari antigen permukaan HBV (HBsAg), yang berbeda dalam ekstensi ujung N-terminalnya, yakni protein M memiliki domain Pre-S₂, sedangkan protein L memiliki domain Pre-S₁ dan Pre-S₂ (Pollicino *et al.*, 2014). Protein Pre-S₂ memiliki peran penting dalam infeksi dan invasi hepatosit, terutama melalui interaksi dengan reseptor albumin serum manusia terpolimerisasi (PHSA) yang memungkinkan HBV masuk ke dalam sel hati melalui mekanisme pinositosis. Selain itu, protein Pre-S₂ juga terlibat dalam proses replikasi virus, perakitan partikel virus, serta stimulasi respons imun tubuh terhadap infeksi HBV. Penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2018) menemukan bahwa mutasi Pre-S₂ berkontribusi pada rendahnya ekspresi HBsAg, yang berpotensi menyebabkan infeksi tersembunyi (*occult infection*) dan lolos dari deteksi serologis konvensional. Selain itu, mutasi pada gen Pre-S₂, terutama dalam bentuk delesi atau mutasi *start codon*, dapat menyebabkan terganggunya produksi protein M dan penumpukan abnormal protein amplop dalam retikulum endoplasma (ER) hepatosit. Akumulasi ini dapat memicu stres ER, kerusakan oksidatif DNA, dan instabilitas genom, yang menjadi jalur penting dalam patogenesis sirosis dan kanker hati (HCC) (Pollicino *et al.*, 2014). Oleh karena itu, deteksi spesifik terhadap gen Pre-S₂ dapat memberikan wawasan penting dalam pemantauan infeksi HBV serta dalam pengembangan strategi pengobatan dan pencegahan.

Deteksi genom virus Hepatitis B (HBV) saat ini dilakukan melalui dua pendekatan utama, yaitu uji serologi dan uji molekuler. Uji serologi mendeteksi keberadaan antigen dan antibodi seperti HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, dan anti-HBc, sementara uji molekuler digunakan untuk mendeteksi dan mengukur DNA HBV, mengidentifikasi genotipe, mutasi, serta resistensi terhadap terapi. Metode molekuler yang tersedia meliputi *quantitative* PCR (qPCR), *rolling circle amplification* (RCA), *digital droplet* PCR (ddPCR), dan *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). qPCR banyak digunakan karena sensitif, namun dapat menghasilkan negatif palsu jika konsentrasi DNA rendah (Christian dkk., 2024). Akan tetapi,

belum banyak studi yang secara khusus memfokuskan deteksi pada wilayah gen Pre-S2. Selain itu, sebagian besar kit komersial yang ada masih menargetkan gen S atau pol sehingga masih terdapat peluang untuk mengembangkan primer yang spesifik terhadap gen Pre-S2 sebagai target diagnostik yang lebih sensitif dan terarah.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk merancang pasangan primer secara *in silico* yang spesifik untuk amplifikasi gen Pre-S2 virus Hepatitis B. Perancangan dilakukan menggunakan pendekatan bioinformatika dengan mempertimbangkan parameter fisikokimia seperti T_m , GC *content*, potensi dimerisasi, dan kesesuaian dengan berbagai isolat HBV yang ada di *database* publik. Dengan pendekatan ini, diharapkan primer yang dihasilkan dapat digunakan untuk amplifikasi gen Pre-S2 secara efisien dalam aplikasi PCR, baik untuk keperluan diagnostik, penelitian mutasi, maupun pelacakan molekuler HBV.

Secara umum, tujuan dari penelitian ini adalah untuk menghasilkan pasangan primer PCR yang dirancang secara *in silico* dan tervalidasi secara spesifik terhadap wilayah gen Pre-S2 HBV. Primer yang dihasilkan diharapkan dapat menjadi alat bantu molekuler dalam deteksi dan studi lebih lanjut terhadap gen ini, khususnya yang berkaitan dengan variasi genetik HBV, kegagalan vaksinasi, dan risiko karsinogenesis.

METODE PENELITIAN

Studi ini menggunakan pendekatan *in silico* untuk merancang primer spesifik yang menargetkan gen Pre-S2 dari virus Hepatitis B (HBV). Informasi urutan genom lengkap HBV diperoleh dari basis data GenBank NCBI (Pusat Informasi Bioteknologi Nasional) dengan nomor akses AB246345.1 (Gambar 1). Berdasarkan literatur dan anotasi genom, wilayah gen Pre-S2 diidentifikasi berada pada posisi nukleotida 835 hingga 998. Urutan sekuens DNA pada rentang tersebut kemudian diambil dan dimasukkan ke perangkat lunak berbasis web Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) untuk melakukan perancangan primer. Berdasarkan hasil desain, diperoleh lima pasang kandidat primer yang memenuhi parameter dasar seperti panjang primer, T_m , dan komposisi GC. Setiap kandidat primer dievaluasi lebih lanjut untuk menghindari kemungkinan pembentukan struktur sekunder yang tidak diinginkan, seperti *hairpin* dan *self-dimer*.

```

>AB246345.1:2848-3215,1-835 Hepatitis B virus DNA, complete genome, clone: C_JPNAT
ATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCCAATCCTCTGGGAT
TCTTTCCCGATCACCAGTTGGACCCGGCGTTCGGAGCCAATCAAACAATCCAGATTGGGACTTCAACCC
CAACAAGGATCATTGGCCAGAGGCAAATCAGGTAGGAGCGGGAGCATTGGGGCCAGGGTTACCCACCA
CACGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCCACAGGCACAGGGCGTATTGACAACCGTGCCAGTAGCACCTCCTC
CTGCCCTCCACCAATCGGCAGTCAGGAAGACAGCCTACTCCCATCTCTCCACCTCTAAGAGACAGTCATCC
TCAGGCCATGCAATGGAACCTCCACAACATTCACCAAGCTCTGCTAGACCCAGAGTGAGGGGCTATAT
CTTCTCTGTTGGTGGCTCCAGTTCGGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACTACTGCCCTACCCATATCGTCAA
TCTTCTCGAGGACTGGGGACCTGCCACGAACATGGAGAACACAACATCAGGATTCTTAGGACCCCTGCT
CGTGTACAGGCGGGTTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCAGAGTCTAGACTCGTGGTGG
ACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGCTCGGCCAAAATTCGACGTCGCCAACCTCCAATC
ACTCAACAACCTCTGTCTCCAATTTGCTGGCTATCGCTGGATGTGCTCGGGCGTTTTATCATATT
CCTCTTTCATCTGTGTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTATGTTGCCGTT
TGTCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGATTCTGCTCAAG
GAACCTCTATGTTTCCCTCTTGTGTGTACAAAACCTTCGGACGGAAACTGCACCTTGATTCCCATCCC
ATCATCCTGGGCTTTCGCAAGATTCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTACTA
GTGCCATTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGGT
ATTGGGGCCAAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTTACCTCTATTACCAATTTTCTTTTGTCTTTG
GGTATACATTTGA

```

Gambar 1. Urutan Gen Pre-S2 (*Accession Number* AB246345.1)

Salah satu kandidat pasangan primer yang paling memenuhi kriteria fisikokimiawi kemudian dipilih untuk dilakukan uji spesifisitas menggunakan fitur Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Primer yang telah dipilih dimasukkan ke dalam program bersama dengan pengaturan target pada virus Hepatitis B (taxid: 10407), untuk memastikan bahwa primer hanya mengikat secara spesifik pada genom HBV dan tidak menunjukkan hasil positif palsu pada organisme lain. *Output* dari Primer-BLAST berupa lokasi ikatan primer dan ukuran produk PCR (*amplikon*) dianalisis untuk mengonfirmasi bahwa primer menargetkan wilayah yang sesuai pada gen Pre-S2 dan menghasilkan amplifikasi yang spesifik terhadap HBV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen Pre-S2 adalah bagian dari gen Pre-S pada genom *Hepatitis B virus* (HBV) yang menyandi protein permukaan virus (*surface antigen*), bersama dengan domain Pre-S1 dan S (Wang et al., 2018). Protein permukaan ini sangat penting karena berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang serta dalam proses pengenalan sistem imun terhadap virus. Oleh karena itu, wilayah Pre-S2 menjadi target penting dalam berbagai studi molekuler, termasuk untuk keperluan diagnosis, vaksin, serta terapi berbasis gen. Untuk menganalisis wilayah genetik ini secara akurat, salah satu tahapan kunci adalah desain primer yang efisien dan spesifik guna mendukung keberhasilan proses amplifikasi DNA melalui PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Parameter yang harus dipenuhi untuk menyatakan bahwa primer tersebut baik adalah panjang primer, *melting temperature* (T_m), persentase jumlah G dan C (%GC), dan potensi terbentuknya *self-dimer*. Masing-masing parameter tersebut saling berhubungan dan mempengaruhi efisiensi serta spesifisitas dari proses PCR.

Primer yang ideal umumnya memiliki panjang 18–30 oligonukleotida. Panjang ini dinilai memadai untuk memberikan kestabilan dalam proses hibridisasi dengan template DNA, serta untuk memastikan bahwa hanya target spesifik yang diamplifikasi. Primer yang terlalu pendek cenderung kurang spesifik, sementara primer yang terlalu panjang dapat menurunkan efisiensi karena membutuhkan waktu annealing yang lebih lama dan meningkatkan kemungkinan pembentukan struktur sekunder yang tidak diinginkan. Panjang basa nukleotida yang sering disarankan dalam desain primer berkisar antara 20–30 bp, karena rentang ini memberikan keseimbangan antara kestabilan termodinamika dan spesifisitas.

Suhu leleh atau *melting temperature* (T_m) adalah parameter penting lain yang menunjukkan suhu di mana 50% dari primer yang telah menempel akan melepaskan diri dari template. Nilai T_m yang ideal berkisar antara 42 hingga 65 °C. Nilai T_m yang terlalu rendah menyebabkan primer mudah lepas dari template, sedangkan T_m yang terlalu tinggi menyebabkan kesulitan dalam proses annealing, sehingga bisa menghambat efisiensi amplifikasi DNA. Selain itu, perbedaan T_m yang terlalu besar antara primer forward dan reverse (lebih dari 2–3 °C) dapat mengganggu keseimbangan selama siklus PCR, sehingga akan mempengaruhi kualitas hasil amplifikasi. Oleh karena itu, kesetaraan nilai T_m antara kedua primer penting untuk efisiensi dan konsistensi reaksi PCR (Suwarny dkk., 2025).

Persentase kandungan guanin (G) dan sitosin (C), atau yang dikenal sebagai nilai %GC, juga menjadi faktor penting dalam desain primer. Kandungan GC yang tinggi dapat meningkatkan kestabilan ikatan primer dengan template karena ikatan $G \equiv C$ memiliki tiga ikatan hidrogen, dibandingkan dua ikatan pada $A = T$. Namun, nilai GC yang terlalu tinggi (di atas 60%) dapat menyebabkan pembentukan struktur sekunder yang kompleks, sedangkan nilai yang terlalu rendah (di bawah 40%) dapat menyebabkan primer terlalu mudah terdisosiasi. Oleh karena itu, kisaran optimal %GC biasanya berada pada 40–60%, yang memberikan keseimbangan antara kestabilan dan efisiensi pengikatan.

Berdasarkan hasil rancangan, diperoleh lima pasang kandidat primer yang memiliki rentang suhu leleh (T_m) antara 59,9 °C hingga 60,1 °C, panjang primer 20 basa, dan kandungan GC yang berkisar antara 45–60%, sehingga semuanya masih memenuhi standar umum desain primer yang baik (Tabel 1). Seluruh pasangan primer menunjukkan potensi yang baik untuk digunakan dalam reaksi PCR, namun dilakukan seleksi lebih lanjut berdasarkan parameter tambahan, yaitu potensi pembentukan struktur sekunder.

Kandidat pasangan primer ke-5 dipilih sebagai primer terbaik karena memiliki parameter fisikokimiawi yang optimal. Suhu leleh primer forward sebesar 60,1 °C dan reverse sebesar 60,0 °C menunjukkan kesetaraan nilai T_m yang sangat ideal. Panjang kedua primer

adalah 20 basa, yang masuk dalam rentang ideal untuk memastikan kestabilan dan spesifisitas. Selain itu, parameter *self-complementarity* yang rendah, yakni 1,0 untuk primer forward dan 0,0 untuk primer reverse, menandakan bahwa risiko pembentukan struktur sekunder sangat kecil. Struktur sekunder yang dimaksud termasuk *hairpin* dan *self-dimer*, yang jika terbentuk dapat menghambat reaksi PCR secara signifikan.

Hairpin adalah struktur di mana primer melipat dan menempel pada dirinya sendiri, membentuk loop akibat adanya sekuens yang saling komplementer dalam satu untai. Struktur ini menghambat kemampuan primer untuk menempel pada target DNA. Sementara itu, *self-dimer* terjadi jika dua molekul primer yang sama berikatan satu sama lain, bukan dengan template DNA, sehingga mengurangi efisiensi reaksi PCR dan meningkatkan risiko hasil amplifikasi non-spesifik (Aulia dkk., 2023). Oleh karena itu, nilai *self-dimer* dan *hairpin* yang rendah menjadi syarat mutlak dalam penentuan primer terbaik.

Dengan memperhatikan seluruh aspek di atas — mulai dari panjang, T_m , %GC, hingga potensi struktur sekunder — maka pemilihan kandidat pasangan primer ke-5 dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Primer ini diprediksi mampu menghasilkan amplifikasi DNA yang spesifik, efisien, dan bebas dari gangguan non-spesifik yang dapat mengganggu interpretasi hasil. Selain itu, primer sebaiknya tidak memiliki urutan nukleotida atau basa yang berulang (*repeats*) agar tidak terjadi penempelan primer pada tempat yang tidak diharapkan. *Repeats* yang ditoleransi adalah hanya sampai 4 kali. Pada kandidat pasangan primer ke-5 ditemukan pengulangan 4 kali pada primer *reverse* (Yustinadewi dkk., 2018).

Tabel 1. Hasil Rancangan Desain Primer Menggunakan Primer3Plus

Primer pair No.	Primer sequence	Panjang primer	T_m (°C)	Ukuran produk (bp)	GC content	Amplification Size (bp)
1.	F: GACTTCAACCCCAACAAGGA	20	59,9	272	50,0	272
	R: GGGTCTAGCAGAGCTTGGTG	20	60,0	272	60,0	
2.	F: CCTCCAATTTGCCTGGCTA	20	60,1	163	50,0	163
	R: GTCCCGTGCTGGTAGTTGAT	20	60,0	163	55,0	
3.	F: CCTCCAATTTGCCTGGCTA	20	60,1	244	50,0	244
	R: AGTTCCGTCCGAAGGTTTT	20	60,0	244	45,0	
4.	F: TCCAGATTGGGACTTCAACC	20	59,9	282	50,0	282
	R: GGGTCTAGCAGAGCTTGGTG	20	60,0	282	60,0	
5.	F: TTCCTCTTCATCCTGCTGCT	20	60,1	193	50,0	193
	R: AGTTCCGTCCGAAGGTTTT	20	60,0	193	45,0	

Selanjutnya, kandidat pasangan primer tersebut divalidasi menggunakan Primer-BLAST dengan spesifikasi pencarian terbatas pada organisme Hepatitis B virus (taxid: 10407) (Gambar 2 dan Gambar 3). Hasil Primer-BLAST menunjukkan bahwa primer *forward* (TTCCTCTTCATCCTGCTGCT) dan *reverse* (AGTTTCCGTCCGAAGGTTTT) mampu mengamplifikasi target secara spesifik dengan panjang produk PCR sebesar 193 bp, dan mengikat pada sekuens Pre-S2 dalam berbagai isolat HBV dari gen S dan pol tanpa menunjukkan afinitas terhadap organisme lain (Tabel 2). Kesesuaian panjang amplicon ini dengan rentang ideal untuk deteksi PCR (sekitar 100–300 bp) mendukung efisiensi amplifikasi. Temuan ini menunjukkan bahwa primer kelima tidak hanya memenuhi kriteria desain secara teoritis, namun juga terbukti spesifik terhadap target yang diinginkan, sehingga dapat digunakan sebagai kandidat primer yang valid untuk amplifikasi gen Pre-S2 HBV secara molekuler.

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand):

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand):

PCR product size: Min Max

of primers to return:

Primer melting temperatures (T_m): Min Opt Max Max T_m difference

Primer Location Preference: Prefer primers at 3' side of the template

Gambar 2. Input Desain Kandidat Pasangan Primer 5 pada Primer BLAST (*Primer Parameters*)

Primer Pair Specificity Checking Parameters

NOTE: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Specificity check: Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode:

Database:

Exclusion: Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism:

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

Entrez query (optional):

Primer specificity stringency: Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end. Ignore targets that have or more mismatches to the primer.

Max target amplicon size:

Allow splice variants: Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Gambar 3. Input Desain Kandidat Pasangan Primer 5 pada Primer BLAST (*Primer Pair Specificity Checking Parameters*)

Tabel 2. Hasil Primer BLAST *Pair 5*

No.	<i>Accession Number</i>	<i>Strain</i>	Target genetik	<i>Amplification Size (bp)</i>	Keterangan
1.	GU594144.1	DH04UAE	<i>S protein-like gene</i>	193	Sesuai dengan wilayah Pre-S2
2.	DQ873489.1	Alaska1364	<i>S protein-like gene</i>	193	Spesifik HBV
3.	DQ852982.1	Alaska831	<i>polymerase gene</i>	193	Mengonfirmasi cakupan luas
4.	LC522124.1	C173433 P	<i>preS/S, S genes</i>	193	Eksplisit menyebut "preS"
5.	KY361736.1	ZJG009A-9	<i>S protein (S) gene</i>	193	Amplifikasi spesifik gen S

SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pendekatan *in silico* efektif digunakan dalam merancang primer spesifik untuk deteksi molekuler virus Hepatitis B. Desain primer yang diperoleh menghasilkan pasangan primer terbaik untuk deteksi gen Pre-S2 virus Hepatitis B, yaitu primer *forward* 5'-TTCCTCTTCATCCTGCTGCT-3' dan primer *reverse* 5'-AGTTTCCGTC CGAAGGTTTT-3'. Desain primer tersebut mampu mengamplifikasi daerah gen Pre-S2 dengan ukuran produk PCR (amplikon) sepanjang 193 bp dan menunjukkan spesifitas tinggi terhadap berbagai isolat HBV berdasarkan hasil Primer-BLAST.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, R., & Susiloningsih, J. (2013). Faktor resiko yang berhubungan dengan kejadian hepatitis B pada Pondok Pesantren Putri Ibnuul Qoyyim Yogyakarta. *Sains Medika*, 5(1), 30–33.
- Annisa. (2019). *Virus hepatitis B di Indonesia dan risiko penularan terhadap mahasiswa*. [Skripsi]. [Institusi tidak dicantumkan].
- Aulia, N., Ahda, Y., Achyar, A., & Putri, D. H. (2023). Desain primer dan optimasi suhu annealing untuk amplifikasi gen RET. *Jurnal Biology Science & Education*, 12(1), 70–77.
- Christian, J. E., Yuliawuri, H., Gunawan, N., & Charlotte, Y. (2024). Uji diagnostik virus hepatitis B dan CRISPR-Cas sebagai alternatif: Sebuah tinjauan pustaka. *Journal of Medixine and Health (JMh)*, 6(1), 103–114.
- Kedokteran. (n.d.). *Anatomica Medical Journal*, 2(2), 66–72.
Catatan: Penulis dan tahun tidak jelas, disesuaikan sebagai sumber tanpa nama penulis dan tahun.

- Lestari, G. D., & Kafesa, A. (2024). Kajian penanganan hepatitis B berdasarkan perilaku dan pemeriksaan molekuler. *Mahesa: Malahayati Health Student Journal*, 4(11), 5095–5105.
- Nadia, F., & Anggina, D. (2021). Analisis penyebab hepatitis B ibu hamil (studi fenomenologi) di wilayah Puskesmas Perhentian Raja Kabupaten Kampar. *Jurnal Ilmu Kebidanan (Journal of Midwifery Sciences)*, 10(1), 33–40.
- Pollicino, T., Cacciola, I., Saffioti, F., & Raimondo, G. (2014). Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. *Journal of Hepatology*, 61, 408–417.
- Suratno, & Sartika, F. (2020). Seroprevalensi hepatitis B pada pemulung sampah di Kota Palangka Raya. *Jurnal Surya Medika*, 5(2), 120–128.
- Suwarny, P., Purnama, T., & Sanatang. (2025). Perancangan primer secara *in silico* untuk amplifikasi gen IGF1 menggunakan aplikasi bioinformatika. *Bioma: Jurnal Biologi Makassar*, 10(1), 94–100.
- Wang, T., Dai, Y., Zhang, M., Cui, D., Xu, X., Sun, C., & Cheng, J. (2018). Sequence analysis of the Pre-S gene in chronic asymptomatic HBV carriers with low-level HBsAg. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(5), 2689–2699.
- World Health Organization (WHO). (2024). *Global hepatitis report 2024*. Geneva: World Health Organization.
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Teknik perancangan primer untuk sekuen gen MDR-1 varian 1199 pada sampel buffy coat pasien anak dengan LLA. *Jurnal Metamorfosa*, 5(1), 105–111.