



DESAIN PRIMER PCR SPESIFIK SECARA *IN SILICO* UNTUK AMPLIFIKASI GEN COX-1 (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) DNA MITOKONDRIA PADA *Aedes aegypti*

DESIGN OF SPECIFIC PCR PRIMERS *IN SILICO* FOR COX-1 (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) GENE AMPLIFICATION MITOCHONDRIA DNA IN *Aedes aegypti*

Moh. Mirza Nuryady^{1*}, Elly Purwanti¹, Siti Nur Aldina¹, Sri Wahyuni¹, Tutut Indria
Permana¹, Zakiyatul Khoiriyah², Kiky Martha Ariesaka³

¹Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Muhammadiyah Malang

²Master of Biology, Wageningen University and Research, Netherland

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Negeri Malang

*Corresponding author: mirzanuryady@umm.ac.id

Naskah Diterima: 11 Juli 2023; Direvisi: 17 Agustus 2023; Disetujui: 9 Oktober 2023

Abstrak

Gen COX-1 (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) merupakan salah satu marker molekuler untuk identifikasi spesies berdasarkan DNA mitokondria. Tujuan dilakukannya penelitian ini, yaitu untuk mendapatkan primer gen COX-1 yang spesifik terhadap nyamuk *A. aegypti*. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional yaitu dengan melakukan desain primer secara *in silico* dan konfirmasi secara *in vitro* ditandai dengan pita DNA hasil PCR. Langkah pertama dari metode ini, yaitu dengan mengunduh urutan DNA COX-1 *Aedes aegypti* dari Gene Bank (NCBI) dengan nomor akses DQ397892.1. Hasil dari Primer3web diperoleh dua primer yang spesifik, yaitu primer pertama memiliki sekuen F'AGCAACTTTACACGGAAGTCA dan R'TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT dan pada primer kedua F' AGTCCAGCCCTTCTATGATCA dan R' TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT. Optimasi primer pada tahap konfirmasi dilakukan dengan kisaran suhu *annealing* 46, 48, dan 52 °C didapatkan hasil visualisasi elektroforesis yang menunjukkan adanya pita DNA dengan ukuran +600 bp pada ketiga kondisi suhu. Kesimpulan pada penelitian ini adalah didapatkan dua primer yang spesifik terhadap gen COX-1 *Aedes egypti*.

Kata kunci: *Aedes aegypti*; *Cytochrome oxidase subunit I*; Desain primer; *In silico*; PCR

Abstract

The COX-1 gene (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) is one of the molecular marker for species identification based on mitochondrial DNA. The purpose of this study was to obtain specific COX-1 gene primers for *A. aegypti* mosquitoes. This research was an observational descriptive study, namely by carrying out the primary design *in silico* and *in vitro* confirmation marked by DNA bands from PCR results. The first step of this method is to download the COX-1 *Aedes aegypti* DNA sequence from the Gene Bank (NCBI) with accession number DQ397892.1. The results from Primer3web obtained two specific primers, namely, the first primer had the sequences F'AGCAACTTTACACGGAAGTCA and R'TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT and the second primer had F'AGTCCAGCCCTTCTATGATCA and R'TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT. Primer optimization at the confirmation stage was carried out with annealing temperature ranges of 46, 48, and 52 °C. The results of electrophoretic visualization showed the presence of DNA bands with a size of +600 bp at all three temperature conditions. The conclusion of this study was that there were two specific primers for the COX-1 gene of *A. aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Cytochrome oxidase subunit I*; *In silico*; PCR; Primer design

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v18i1.33726>

PENDAHULUAN

Nyamuk *Aedes aegypti* tergolong kedalam ordo *Diptera* dari keluarga *Culicidae*. Di Indonesia telah ditemukan sebanyak 125 spesies *Aedes* sp. yang menjadi vektor penyakit (Lema et al., 2021). Salah satu penyakit yang diakibatkan oleh *A. aegypti* yaitu demam berdarah dengue (DBD). Penyakit tersebut disebabkan oleh virus dengue, yang tergolong genus *Flavivirus*, dari keluarga *Flaviviridae* (Agustin, 2017). Penyakit ini tidak segera ditangani, terjadi gangguan hemodinamika dan perdarahan sehingga akan meningkatkan risiko kematian. Peningkatan kejadian DBD karena kemungkinan pengendalian vektor yang belum maksimal. Vektor utama DBD adalah *A. aegypti* serta terdapat juga spesies lain seperti *A. albopictus*, *A. polynesiensis*, dan *A. scutellaris* yang dianggap sebagai vektor sekunder (Sayono & Nurullita, 2016). Sejumlah spesies *Aedes* mampu menjadi vektor DBD mengakibatkan pentingnya identifikasi molekuler untuk memaksimalkan upaya pengendalian vektor, karena setiap spesies memiliki kapasitas vektorial yang berbeda, sehingga identifikasi spesies sangat penting. Pengendalian DBD berbasis vektor sangat bergantung pada pengetahuan yang komprehensif tentang keragaman genetik *A. aegypti* (Wahyuni et al., 2018).

Identifikasi molekuler merupakan metode yang bertujuan untuk mengetahui mekanisme molekuler suatu genom pada tiap spesies. Pemeriksaan menggunakan metode berbasis molekuler adalah teknik yang dapat menggunakan reaksi rantai polimerase (PCR). Deteksi keragaman dan kekerabatan dapat dilakukan dengan teknik PCR karena mampu memperbanyak jumlah DNA (Ka'bah & Zulkarnain, 2022). Metode identifikasi spesies berbasis marka molekuler dengan menggunakan DNA *barcoding* yang didasarkan pada sekuens DNA. Salah satu cara untuk identifikasi spesies secara akurat dengan memanfaatkan DNA *barcoding* sebagai penanda spesies terhadap daerah gen yang spesifik. Konsep dari metode ini adalah setiap spesies memiliki identitas genetik yang unik yang mencirikan spesies tersebut (Senjarini et al., 2021). Identifikasi vektor dari spesies *A. aegypti* dapat dilakukan dengan teknik molekuler, yang memanfaatkan DNA mitokondria salah satunya COX-1. Pemilihan COX-1 sebagai marker molekuler karena mengalami delesi dan insersi yang sedikit pada sekuensnya dan bersifat *conserve* di bagian lainnya serta terdapat banyak bagian pada DNA COX-1 bersifat *converse* (Suriana et al., 2019). DNA COX-1 memenuhi syarat sebagai penentu identitas spesies tingkat tinggi, karena adanya susunan asam amino dari protein yang disandi gen COX-1 bersifat stabil dan jarang terjadinya substitusi (Suriana et al., 2018).

Penerapan identifikasi molekuler yang menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) maka membutuhkan pasangan primer, sehingga perlu dilakukan desain primer terlebih dahulu. Desain primer dilakukan untuk memperoleh primer yang spesifik terhadap spesies. Desain primer dapat dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan *software bioinformatic* (Pahlevi, 2016). Perancangan primer menggunakan program NCBI, Primer3web dan Primer-BLAST (Nuryady et al., 2020).

Penelitian sejenis dilakukan oleh Garjito et al. (2021) dengan menggunakan primer konsensus universal COX-1 pada beberapa jenis nyamuk *Aedes* salah satunya *A. aegypti*. Penelitian tersebut bertujuan untuk mengkaji hubungan filogenetik pada *A. aegypti* dengan gen target yang berbeda-beda, di antaranya dengan menggunakan gen ITS2 dan COX-1. Namun, hasil penelitian tersebut masih belum menunjukkan hubungan filogenetik yang dapat dibuktikan secara pasti pada *A. aegypti* di Indonesia. Oleh karena itu, perlu dilakukan desain primer spesifik pada DNA penyandi COX-1 yang dirancang secara *in silico* agar diperoleh sekuens gen target yang tepat khususnya pada *A. aegypti* sehingga, penelitian ini sangat penting untuk dilakukan. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam pengembangan analisis filogenetik berdasarkan DNA target COX-1 mitokondria *A. aegypti* dan dapat digunakan sebagai penelitian lanjutan untuk proses sekuensing atau penelitian molekuler lainnya.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juli–Oktober 2022 bertempat di Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang yang beralamat di Jalan Raya Tlogomas Nomor 246, Lowokwaru, Kota Malang. Penelitian ini mendapatkan pembebasan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang pada surat keterangan layak etik dengan nomor E.5.a/262/KEPK-UMM/XII/2021.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel DNA genom *Aedes aegypti*, desain primer *online* COX-1, PCR master mix, agarosa, TBE 1x, dan sampel DNA nyamuk *A. aegypti*. Sampel nyamuk *Aedes aegypti* dewasa baik jantan maupun betina sebanyak 400 ekor yang diperoleh dari hasil *rearing* larva dan pupa di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang dari empat kecamatan, yaitu Lowokwaru, Klojen, Blimbing, dan Sukun. Teknik sampling menggunakan teknik *purposive sampling*, dengan pemilihan subjek penelitian berdasarkan atas ciri-ciri maupun sifat tertentu yang berkaitan dengan karakteristik populasi.

Desain Primer Online

Desain primer diawali dengan penentuan gen target *A. aegypti* melalui program *Gen Bank* NCBI (Nomor akses NCBI DQ397892.1) dengan penyandi COX-1 (*Cytochrome Oxidase Subunit I*). Penentuan area yang akan dijadikan sebagai target amplifikasi pada gen tersebut dengan panjang maksimal 900 *basepair* (bp). Potongan gen target tersebut akan diproses dengan Primer3web (<https://primer3.ut.ee/>). Tahapan selanjutnya yaitu mengatur ukuran produk amplifikasi gen target, primer *Time melting* (Tm) dan persentase komposisi GC (Tabel 1). Primer yang sesuai dengan persyaratan selanjutnya dicek kembali menggunakan Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) untuk menentukan primer yang spesifik terhadap spesies *A. aegypti* dengan penyandi COX-1.

Tabel 1. Komponen yang perlu diperhatikan untuk desain primer (Nuryady et al., 2020)

Komponen	Minimum	Optimum	Maksimum
Primer size	18	23	30
Primer Tm	56	58	59
Product Tm	-1.000	0	1.000
Primer GC%	47	60	63

Identifikasi Larva dan Nyamuk *Aedes aegypti*

Identifikasi larva dilakukan dengan menggunakan mikroskop digital 3.6 MP. Larva yang diamati terlebih dahulu diberikan 1 tetes alkohol dengan menggunakan pipet tetes kemudian diletakkan diatas kaca benda. Selanjutnya dilakukan identifikasi morfologi larva *A. aegypti* dengan melihat ciri khusus yang terdiri dari *caput*, *thorax*, abdomen, ujung abdomen, *ventral brush*, *tuft*, *siphon*, dan *comb*. Identifikasi terhadap nyamuk dewasa dilihat dari ciri tubuh tersusun atas tiga bagian yaitu, kepala, toraks dan abdomen terdapat bercak putih pada bagian perut dan kaki.

Isolasi DNA Genom Nyamuk *Aedes aegypti*

Sampel nyamuk *A. aegypti* sebanyak 5 ekor ditambahkan 100–400 μ L *homogenizing buffer* dan dihomogenkan dengan mikropistil. Ditambahkan SDS sebanyak 40 μ L 20% dan 8 μ L proteinase-K. Selanjutnya inkubasi pada suhu 65 °C selama 2 jam. Ditambahkan 300 μ L NaCl 6 M dan vortex selama 30 detik. Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit suhu 4 °C. Supernatan diambil dan ditambahkan isopropanol *equal* volume lalu inkubasi -20 °C selama 1 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm 3 menit pada suhu 4 °C dan diambil pellet dan ditambahkan 300 μ L ethanol 70%. Sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C dan diambil pellet. Keringkan pellet DNA dari etanol yang masih tersisa dengan menggunakan *vaccum* selama 5–10 menit. Lalu menambahkan sebanyak 50 μ L ddH₂O steril dan simpan DNA hasil isolasi pada suhu -20 °C.

Amplifikasi DNA dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Tahapan PCR diawali dari predenaturasi pada suhu 95 °C selama 3 menit dan dilanjutkan dengan 30 siklus amplifikasi yang terdiri dari denaturasi selama 1 menit pada 95 °C. Tahapan *annealing* selama 1 menit dan untuk suhunya akan dilakukan optimasi menggunakan 3 suhu yang berbeda yaitu 46, 48, dan 52 °C. Serta elongasi selama 1 menit pada 72 °C dan *post* elongasi selama 7 menit pada 72 °C. Tahap denaturasi sampai elongasi dilakukan secara berulang, dan terjadi amplifikasi disetiap siklusnya.

Elektroforesis dan Visualisasi

Elektroforesis dilakukan untuk mendeteksi ada tidaknya hasil reaksi PCR pada DNA target yang dapat teramplifikasi. Tegangan yang digunakan dalam elektroforesis sebesar 50 V dengan waktu 30 menit. Tahapan elektroforesis dibutuhkan gel agarosa 1,5% kemudian gel tersebut dimasukkan ke dalam *electrophoresis apparatus* yang sudah terdapat larutan TBE 1x. Sejumlah sampel DNA dicampurkan dengan *loading buffer* dan dimasukkan dengan perlahan tiap konsentrasi marka DNA dan sampel DNA ke dalam sumur.

Setelah hasil elektroforesis dimasukkan ke dalam *gel documentation* dengan mengaktifkan menu UV transluminator, maka akan muncul pita DNA yang terpendar pada layer *gel documentation*. Hasil pendaran tersebut kemudian disimpan dalam format JPEG dan dapat dilakukan dianalisis untuk menentukan laju dari panjang pita DNA.

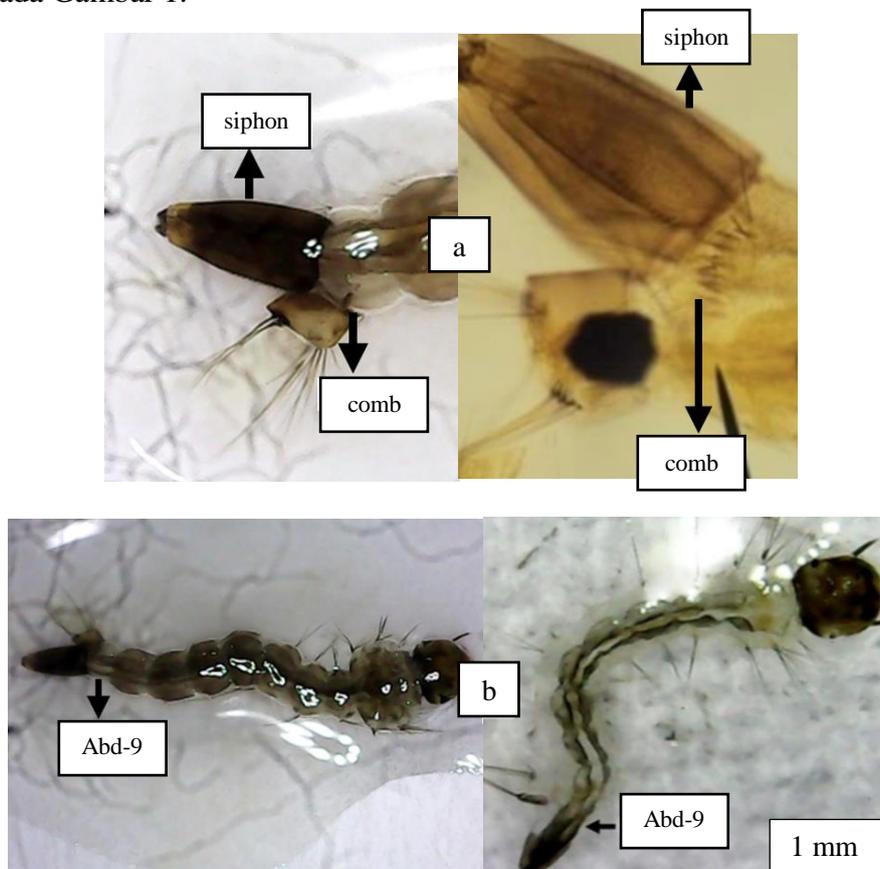
Analisis Data

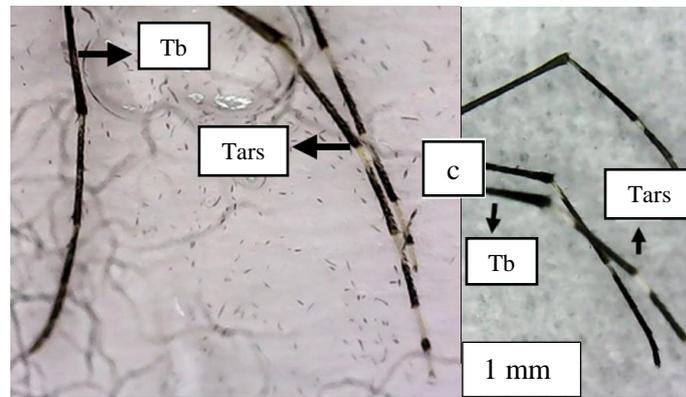
Analisis data dengan melihat adanya pita yang terpendar setelah dilakukan amplifikasi DNA genom *Aedes aegypti* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) melalui tahap elektroforesis. Hasil visualisasi amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *gel documentation*. Selanjutnya pembacaan panjang dan tebal pita DNA akan dibandingkan dengan DNA ladder.

HASIL

Identifikasi Larva dan Nyamuk *Aedes aegypti*

Hasil identifikasi nyamuk dengan spesies *Aedes aegypti* menggunakan mikroskop digital 3.6 MP disajikan pada Gambar 1.





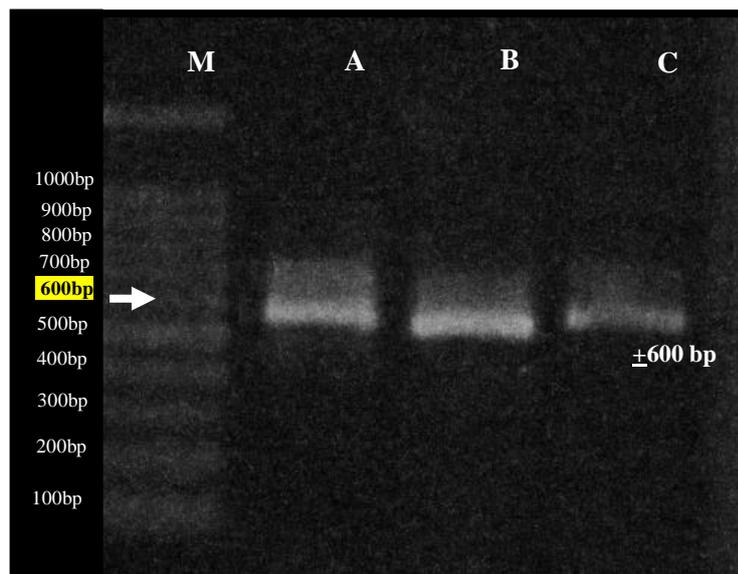
Gambar 1. Hasil identifikasi nyamuk *Aedes aegypti*, yaitu kiri= dokumen pribadi; kanan= Qibtiyah et al. (2022) dan Widiyanti (2013); segmen abdomen larva *Aedes aegypti* (a), larva *Aedes aegypti* (Abd-9= abdomen ke-9) (b); dan bagian tungkai nyamuk *Aedes aegypti* dewasa (Tb= tibia; Tars= tarsius) (c)

Desain Primer

Berdasarkan penelitian desain primer secara *online* menggunakan program seperti NCBI, Primer3web, dan Primer-BLAST didapatkan 2 desain primer *A. aegypti* yang spesifik dengan DNA penyandi COX-1 (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil desain primer COX-1 nyamuk *Aedes aegypti* secara daring

Oligo	Start	Panjang	Tm	GC%	Sekuen
Left primer	225	21	57,81	42,86	AGCAACTTTACACGGAECTCA
Right primer	761	20	58,87	50,00	TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT
Left primer	256	21	57,95	47,62	AGTCCAGCCCTTCTATGATCA
Right primer	761	20	58,87	50,50	TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA nyamuk *Aedes aegypti* dengan primer COX-I pada suhu *annealing*. Marker (M); 46 °C (A-primer 1); 52 °C (B-primer 2); 48 °C (C-primer 1)

Perbandingan parameter optimum (Tabel 1) desain primer dengan (Tabel 2) hasil desain primer dapat diketahui bahwa hasil yang diperoleh dari 2 primer tersebut memiliki batas optimum tertentu untuk didapatkan hasil yang baik pada tiap primernya. Panjang primer *size* dari kedua primer memenuhi parameter optimum dari rentang 20–21bp. Terdapat primer Tm dengan batas minimum 56, optimum 58, dan maksimum 59. Dari batas tersebut telah memenuhi parameter optimum pada primer Tm yaitu pada desain primer 1 (57,81; 58,87) dan desain primer 2 (57,95; 58,87). Adapun primer GC% pada primer 1 diperoleh hasil GC% dibawah batas minimum yaitu 42,86 di bagian *left*

primer dan 50,00 *right primer*. Sedangkan primer 2 telah memenuhi batas minimum hingga maksimum dari rentang 47–50 baik *left primer* dan *right primer*. Berdasarkan hasil perbandingan parameter tersebut dapat diperoleh desain primer yang cukup baik dan sesuai dengan daerah target COX-1 pada *A. aegypti*.

Amplifikasi Genome Nyamuk *Aedes aegypti* dengan DNA Penyandi COX-I

Hasil optimasi primer menggunakan PCR pada primer pertama dengan suhu 46 °C dan 48 °C serta primer kedua suhu 52 °C menunjukkan adanya pita DNA yang jelas (Gambar 2).

PEMBAHASAN

Proses identifikasi nyamuk dilakukan sebelum desain primer yang didapatkan hasil dari *landing collection*. Nyamuk *A. aegypti* diidentifikasi menggunakan mikroskop digital 3.6 MP. Pada (Gambar 1b) dapat dilihat larva nyamuk tubuhnya berwarna putih hingga kecokelatan (Sianipar et al., 2018). Gambar 1a menunjukkan bagian segmen abdomen ke 6, 7, dan 8 dan terlihat siphon yang pendek dan gemuk yang merupakan ciri khas dari larva nyamuk *A. aegypti*. Bagian segmen abdomen ke 8 atau 9 terjadi modifikasi membentuk gigi sisir berduri lateral. Dapat dibedakan larva *A. aegypti* dengan genus yang lain, yaitu tertetak pada sirip yang terdapat tiga pasang salah satunya di bagian ventral, terdapat juga antena yang tidak melekat dan tidak ada *setae* yang besar pada *thorax*. Karakteristik lainnya yaitu larva *A. aegypti* dapat bergerak aktif dan lincah di dalam air bersih, jika istirahat larva terlihat tegak lurus dengan permukaan air (Susanti & Suharyo, 2017). Nyamuk *A. aegypti* memiliki ciri khusus dapat dilihat pada (Gambar 1c) yang ditandai dengan pita atau garis putih keperakan dengan dasar hitam pada bagian kakinya (Agustin, 2017). Dibandingkan dengan nyamuk lain *A. aegypti* memiliki ukuran lebih kecil. Nyamuk *A. aegypti* memiliki ciri tubuh berwarna hitam ditutupi sisik, bagian kakinya memiliki bercak putih keperakan. Bagian seperti abdomen juga terdapat bintik dan di bagian *thorax* berbentuk seperti kecapi dan terdapat garis putih (Trovancia et al., 2016). Setelah identifikasi nyamuk kemudian akan dilakukan tahapan desain primer untuk analisis PCR.

Desain primer didasarkan pada data DNA target yang tersedia di *Gen Bank*, namun apabila primernya tidak diketahui dapat menggunakan urutan basa DNA dari spesies target. Menurut Sasmito et al. (2014) desain primer salah satu faktor terpenting yang mendukung dari keberhasilan sekuensing DNA. Primer yang akan didesain dalam penelitian ini yaitu gen COX-1, adapun alasan pemilihan gen tersebut didasarkan pada susunan asam amino protein gen COX-1 jarang mengalami substitusi. Sehingga, gen COX-1 stabil dan dapat digunakan sebagai penanda untuk analisis filogenetik, namun basa pada *triple* kodon dapat berubah dan bersifat *silent* yang tidak mengubah jenis asam amino pada saat perubahan basa (Wiradeti et al., 2016). Setelah dilakukannya desain primer kemudian dilanjutkan ketahapan optimalisasi primer melalui uji *trial and error* untuk mendapatkan primer terbaik untuk isolasi DNA secara molekuler (Dewi et al., 2019). Primer yang baik memiliki kesesuaian dengan sekuen target yang akan terpresentasi dengan tepat terhadap genom *A. aegypti* sehingga produk hasil PCR akan spesifik (Musaya et al., 2017).

Hasil desain primer melalui Primer3web didapatkan empat desain primer yang sesuai dengan syarat. Menurut Nuryady et al. (2020) terdapat beberapa syarat primer yaitu primer memiliki panjang berkisar 18–30 bp, primer mengandung 40–60% basa guanin (G) dan sitosin (C). Jika primer terlalu pendek memungkinkan akan kehilangan spesifisitasnya, sehingga primer mudah menempel pada DNA *template* dengan suhu *annealing* yang tidak sesuai. Primer terlalu panjang tidak akan berpengaruh terhadap spesifisitasnya (Pradnyaniti et al., 2013). Primer juga harus memperhatikan *melting temperature* (T_m) antara primer *forward* dan *reverse* tidak terlalu jauh perbedaannya. Keempat primer hasil desain *online* melalui program NCBI akan di proses dengan *software online* Primer3web (version 4.1.0). Hasil desain tersebut kemudian dilakukan Primer-BLAST untuk mengetahui desain primer *online* dapat berikatan dengan gen target yang berada pada Gen Bank (Bedwell & Goldberg, 2020).

Dari keempat desain primer hanya terdapat dua primer dari hasil analisis Primer-BLAST yang spesifik pada gen target *A. aegypti*. Sekuen primer sebaiknya tidak memiliki daerah yang ikatan dengan pasangan primer atau internal primer. Primer tidak boleh memiliki banyak *binding sites* dalam

genom target dan harus menggunakan pasangan basa komplementer (Pradnyaniti et al., 2013). Primer pertama pada bagian *left primer* memiliki panjang 21 bp, dengan GC% 42,86 dan *right primer* 20 bp, GC% 50,00 dan T_m *left primer* 57,8 °C, T_m *right primer* 50,00 °C. F1' primer diperkirakan akan menempel pada sekuens ke-225 di rantai sense COX-1 *Aedes aegypti* dan R1' primer diperkirakan akan menempel pada sekuens ke-761 pada rantai antisense. Hasil desain primer kedua pada *left primer* memiliki panjang 21 bp, dengan GC% 47,62 dan T_m *left primer* 57,95, sedangkan *right primer* 20 bp, GC% 50,50 dan T_m *right primer* 58,87. Menurut Yustinadewi et al. (2018) rendahnya produk hasil PCR dapat karena suhu T_m yang terlalu tinggi. Pengaruh suhu T_m yang rendah juga menyebabkan primer akan menempel di daerah yang bukan targetnya atau tidak spesifik. Ketidakmampuan primer untuk menempel pada daerah *template* secara efektif karena GC% yang rendah sehingga dapat mengurangi efisiensi selama proses PCR (Rahmadhan et al., 2019).

Berdasarkan hasil pada Gambar 2, perlu dilakukan penggandaan DNA *A. aegypti* dengan proses PCR terlebih dahulu. Produk dari amplifikasi PCR berupa terdapatnya pita segmen pada gen target setelah proses *running* menggunakan elektroforesis. Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan ukuran dan berat molekul dan struktur fisik molekulnya (Utami et al., 2013). Perkiraan jumlah *base pair* pita segmen pada gen target perlu dilakukan sebelum proses *running*. Penelitian ini menggunakan marker dengan ukuran 1.000 bp, yang dimasukkan ke dalam gel agarosa 1,5% pada sisi kiri sedangkan produk hasil PCR berada disisi kanan. Urutan tersebut dilakukan agar dapat memudahkan untuk melihat dengan jelas berapa total *base pair* yang akan diperoleh. Penampakan pita DNA dari hasil elektroforesis ditentukan oleh persentase gel agarosa yang digunakan dalam elektroforesis (Widiyanti et al., 2014). Konsentrasi agarosa juga memengaruhi matriks gel, karena rendahnya konsentrasi agarosa akan menyebabkan fragmen DNA dapat terpisah berdasarkan ukurannya (Sinaga et al., 2017). Terdapat faktor lain yang menentukan dari hasil elektroforesis yaitu tegangan voltase karena berpengaruh terhadap laju migrasi DNA. Pada penelitian ini menggunakan tegangan 50 V dengan waktu selama 30 menit. Menurut Harahap (2018) penggunaan voltase dengan tegangan tinggi pada tahapan elektroforesis dapat menyebabkan pemisahan senyawa-senyawa yang memiliki bobot molekul rendah dengan cepat, karena mengalami difusi secara sempurna. Tingginya voltase menyebabkan arus semakin besar sehingga terjadi laju kecepatan migrasi DNA akan bertambah (Rahayu et al., 2012). Namun, bila terlalu besar juga mengakibatkan terjadinya panas berlebih sehingga gel agarosa dalam larutan *buffer* akan meleleh.

Penggunaan pewarna DNA juga memengaruhi hasil pita DNA pada saat didokumentasikan menggunakan *gel documentation*. Pewarnaan pada penelitian ini menggunakan larutan *ethidium bromide* (EtBr). Hal ini sesuai dengan Triani (2020) yang menyatakan bahwa *ethidium bromide* merupakan molekul yang dapat mengikat DNA secara kuat dengan cara menyisip di antara ikatan basa pada untai ganda DNA. Larutan *ethidium bromide* digunakan untuk proses visualisasi dari potongan-potongan DNA yang telah dipisahkan pada *gel documentation*. Hasil visualisasi produk PCR setelah elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA pada sampel yang berhasil di amplifikasi dengan baik. Menurut Iqbal et al. (2016) hasil amplifikasi yang tidak jelas atau terdapat *smear* hal tersebut dapat karena perbedaan konsentrasi DNA hasil ekstraksi di dalam *template* yang digunakan dalam PCR serta perbedaan suhu *annealing* dan konsentrasi DNA yang berhasil teramplifikasi.

Menurut Pertiwi et al. (2015) modifikasi awal perlu dilakukan dalam optimasi PCR dengan memperhatikan *gradient temperature*, hal ini bertujuan untuk mengetahui suhu *annealing* agar dapat menunjukkan hasil amplifikasi dengan baik. Terdapat faktor yang memengaruhi hasil dari penggunaan teknik PCR yang optimal antara lain kuantitas dan kualitas DNA, proses isolasi DNA, suhu *annealing* dan primer yang spesifik (Dewi et al., 2019). Dari hasil keseluruhan *gradient temperature* yang dilakukan, menunjukkan hasil yang baik pada suhu 46, 52, dan 48 °C. Suhu denaturasi juga memengaruhi hasil amplifikasi, suhu yang terlalu rendah dapat mencegah penempelan primer karena DNA untai ganda belum terbuka. Pengaturan optimal diperlukan untuk penempelan primer pada untai DNA yang terbuka. Penghambatan proses amplifikasi diakibatkan suhu yang tinggi, karena primer tidak dapat menempel, dan begitu pula sebaliknya jika suhu terlalu rendah akan menyebabkan primer akan menempel ke daerah yang bukan target pada genom (Sinaga et al., 2017).

Berdasarkan hasil optimasi pada ketiga suhu yang digunakan diperoleh hasil pita fragmen DNA yang hampir sama tebalnya. Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa kedua primer dapat menempel dengan baik pada *template* dengan perbedaan suhu *annealing*. Menurut Astriani et al. (2014) tidak tepatnya pengaturan suhu *annealing* dan jauh dari suhu optimum akan menyebabkan terjadinya *false priming* dan jika terlalu tinggi akan terjadi kegagalan primer untuk menempel pada daerah target. Hasil amplifikasi dengan menggunakan dua primer COX-1 yang telah didesain dapat dilihat pada Gambar 2, yaitu primer pertama dengan suhu *annealing* 46 °C dan 48 °C, (Gambar 2) sedangkan primer kedua suhu 52 °C (Gambar 2). Pita DNA dari fragmen DNA pada primer pertama dan kedua terletak di posisi ± 600 bp yang diketahui setelah proses *running* kemudian divisualisasikan dengan *gel documentation*. Hasil ini membuktikan bahwa desain primer yang di uji sesuai dan dapat mengamplifikasi gen COX-1 *A. aegypti*.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan dua primer yang memenuhi persyaratan dan hasil primer BLAST yang spesifik pada genom nyamuk *A. aegypti* terhadap DNA penyandi COX-1 dengan suhu *annealing* 46 °C dan 48 °C pada primer pertama, dan 52 °C primer kedua. Desain primer pertama memiliki sekuen F'AGCAACTTTACACGGAAGTCA dan R'TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT sedangkan pada primer kedua F'AGTCCAGCCCTTCTATGATCA dan R' TGTTCTGCAGGAGGAAGTGT. Primer dapat mengamplifikasi pada daerah target yang ditunjukkan adanya pita DNA pada ketiga sampel yang berhasil teramplifikasi dengan cukup baik. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dilakukan eksplorasi lebih lanjut terhadap penggunaan suhu *annealing* untuk mendapatkan pita DNA yang lebih tebal (jumlah DNA banyak).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat (DPPM) Universitas Muhammadiyah Malang dengan SKIM Penelitian Pengembangan IPTEK (P2I) Nomor E.2.a/132/BAAUMM/III/2021 atas dana yang telah diberikan.

REFERENSI

- Agustin, I. (2017). Perilaku bertelur dan siklus hidup *Aedes aegypti* pada berbagai media air. *Jurnal Biologi*, 6(4), 71-81.
- Astriani, P. L., Ratnayani, K., & Yowani, S. C. (2014). Optimasi suhu *annealing* dan amplifikasi 0,3 kb GEN *rpoB* di hulu dari Rrdp pada isolat P16 *Mycobacterium tuberculosis* multidrug resistant di Bali dengan metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia*, 2(2), 9-13.
- Bedwell, M. E., & Goldberg, C. S. (2020). Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. *Ecology and Evolution*, 10(3), 1602-1612. doi: 10.1002/ece3.6014.
- Dewi, D. A., Ekawasti, F., Wardhana, A. H., & Sawitri, D. H. (2019). Penggunaan empat set primer dalam mendeteksi trypanosoma evansi pada organ mencit dengan teknik polymerase chain reaction (PCR). *Jurnal Sains dan Teknologi Peternakan*, 1(1), 13-19.
- Garjito, T. A., Widiarti, W., Hidajat, M. C., Handayani, S. W., Mujiyono, M., Prihatin, M. T., ... Frutos, R. (2021). Homogeneity and possible replacement of populations of the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Indonesia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(July), 1-12. doi: 10.3389/fcimb.2021.705129.
- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1), 21-26. doi: 10.22373/crc.v2i1.3248.
- Iqbal, M., Dwi, B. I., & Kurniawati, N. (2016). Analisis perbandingan metode isolasi DNA untuk deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, VII(1), 54-65.
- Ka'bah, K., & Zulkarnain, Z. (2022). Deteksi dini mikrofilariasis penyebab kaki gajah pada kontak serumah yang belum menimbulkan gejala berbasis molekuler. *Teknosains: Media Informasi*

Sains dan Teknologi, 16(1), 49-56. doi: 10.24252/teknosains.v16i1.23988.

- Lema, Y. N., Almet, J., & Wuri, D. A. (2021). Gambaran siklus hidup nyamuk *Aedes* sp. di Kota Kupang. *Jurnal Veteriner Nusantara*, 4(1), 1-13.
- Musaya, J., Chisi, J., Senga, E., Nambala, P., Maganga, E., Matovu, E., & Enyaru, J. (2017). Polymerase chain reaction identification of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in wild tsetse flies from Nkhotakota Wildlife Reserve, Malawi. *Malawi Medical Journal : The Journal of Medical Association of Malawi*, 29(1), 5-9.
- Nuryady, M. M., Husamah, H., Miharja, F. J., Hindun, I., & Patmawati, P. (2020). Desain dan optimasi primer gen pengkode MRPA *Trypanosoma evansi* dan penerapan pada pembelajaran biologi molekuler. *Jurnal Penelitian Dan Pengkajian Ilmu Pendidikan: E-Saintika*, 4(2), 211. doi: 10.36312/e-saintika.v4i2.217.
- Pahlevi, M. R. (2016). Desain primer untuk identifikasi gen GmDREB2 pada kedelai. *Jurnal Agrinis*, 1(1), 1-8.
- Pertiwi, N. P. D., Mahardika, I. G. N., & Watiniasaih, N. L. (2015). Optimasi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada ikan karang anggota Famili *Pseudochromidae* (DOTTYBACK). *Jurnal Biologi*, 19(2), 1-5.
- Pradnyaniti, D., Wirajana, I., & Yowani, S. (2013). Desain primer secara in silico untuk amplifikasi fragmen gen rpoB *Mycobacterium tuberculosis* dengan polymerase chain reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(3), 124-130.
- Qibtiyah, S. M., Nuryady, M. M., Susetyarini, R. E., Permana, T. I., & Sasongkojati, A. (2022). Analisis status resistensi *Aedes aegypti* terhadap insektisida cypermethrin 0,05% di kecamatan endemis Kabupaten Malang. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(1), 240-251.
- Rahayu, S., Nuryadi, R., Aprilia, L., & Purwati, H. (2012). Pengaruh tegangan dan waktu deposisi terhadap pelapisan TiO₂ dengan metode elektroforesis. *Prosiding Industrial Research Workshop and National Seminar*, 3, 173-176.
- Rahmadhan, D., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Pengaruh suhu annealing terhadap amplifikasi gen tem menggunakan primer dengan %GC rendah. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1-7.
- Sasmito, D., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik primer pada polymerase chain reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: Mini review. *Seminar Informatika Medis 2014*, 93-102.
- Sayono., & Nurullita, U. (2016). Situasi terkini vektor dengue (*Aedes aegypti*) di Jawa Tengah. *KEMAS: Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 11(2), 96-105.
- Senjarini, K., Hasanah, L. N. U., Septianasari, M. A., Abdullah, M. K., Oktarianti, R., & Wathon, S. (2021). Karakterisasi berbasis marka molekuler ITS2 terhadap sub-spesies kompleks *Anopheles vagus vagus* dan *Anopheles vagus limosus*. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 8(2), 174-184. doi: 10.29122/jbbi.v8i2.4737.
- Sianipar, M. Y., Anwar, C., & Handayani, D. (2018). Identifikasi larva nyamuk di tempat penampungan air serta pengetahuan, sikap dan tindakan petugas kebersihan tentang perkembangbiakan nyamuk di taman wisata sejarah bukit siguntang Palembang. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan : Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*, 5(2), 78-88. doi: 10.32539/jkk.v5i2.6129.
- Sinaga, A., Putri, L. A. P., & Bangun, M. K. (2017). Analisis pola pita andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* D.C) berdasarkan primer OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09. *Jurnal Agroekoteknologi*, 5(1), 55-64.
- Suriana, S., Jamili, J., & Parakkasi, P. (2018). Karakteristik gen sitokrom C oksidase sub unit I (CO1) lebah liar *Apis cerena* (Hymenoptera: Apidae) asal Pulau Hoga Sulawesi Tenggara. *Jurnal Veteriner*, 19(1), 116. doi: 10.19087/jveteriner.2018.19.1.116.
- Suriana, S., Marwansyah, M., & Amirullah, A. (2019). Karakteristik segmen gen sitokrom C oksidase subunit i (COI) ngengat *Plusia chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae). *BioWallacea : Jurnal Penelitian Biologi (Journal of Biological Research)*, 6(2), 985. doi: 10.33772/biowallacea.v6i2.8824.

- Susanti, S., & Suharyo, S. (2017). Hubungan lingkungan fisik dengan keberadaan jentik *Aedes* pada area bervegetasi pohon pisang. *Unnes Journal of Public Health*, 6(4), 271-276. doi: 10.15294/ujph.v6i4.15236.
- Triani, N. (2020). Isolasi DNA tanaman jeruk dengan menggunakan metode CTAB. *G-Tech: Jurnal Teknologi Terapan*, 3(2), 221-226.
- Trovancia, G., Sorisi, A., & Tuda, J. S. B. (2016). Deteksi transmisi virus dengue pada nyamuk wild *Aedes aegypti* betina di Kota Manado. *Jurnal E-Biomedik*, 4(2). doi: 10.35790/ebm.4.2.2016.14661.
- Utami, S. T., Kusharyati, D. F., & Hendro, P. (2013). Pemeriksaan bakteri *Leptospira* pada sampel darah manusia suspect leptospirosis. *Balaba*, 9(02), 74-81.
- Wahyuni, I., Senjarini, K., Oktarianti, R., Wathon, S., & Hasanah, L. N. U. (2018). Identifikasi morfologi spesies sibling *Anopheles vagus vagus* dan *Anopheles vagus limosus* asal Desa Bangsring, Banyuwangi. *BIOSFER: Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*, June. doi: 10.23969/biosfer.v3i1.1585.
- Widiyanti, N. L. P. M. (2013). Pola perindukan nyamuk yang ditangkap di perindukan di Kabupaten Buleleng dan manfaatnya sebagai bahan praktikum dalam perkuliahan zoologi invertebrata. *Jurnal IKA: Jurnal Ikatan Keluarga Alumni*, 11(1), 27-41.
- Widiyanti, N. L. P. M., Maryam, S., Parwata, I. P., & Mulyadiharja, S. (2014). Perbandingan tampilan pita penanda DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) standar penentuan panjang DNA kromosom pada pemisahan dengan menggunakan media berbeda. *Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA*, 4(1), 306-310.
- Wirdateti., Indriana, E., & Handayani. (2016). Analisis sekuen DNA mitokondria cytochrome oxidase i (COI) mtDNA pada kukang Indonesia (*Nycticebus spp.*) sebagai penanda guna pengembangan identifikasi spesies. *Jurnal Biologi Indonesia*, 12(1), 119-128.
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Mdr-1 gene 1199 variant primer design techniques in pediatric patient buffy coat samples with Lla. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 5(1), 105. doi: 10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16.