



Original article

Desain primer secara *in silico* dan optimasi PCR untuk deteksi gen penyandi *ovary ecdysteroidogenic hormone* (OEH) pada nyamuk *Aedes aegypti* yang terinfeksi *Wolbachia*

In silico primer design and PCR optimization for detection of the gene encoding ovary ecdysteroidogenic hormone (OEH) in *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*

Ni Putu Senshi Septiasari^{1*}, Ni Made Sri Dwijastuti¹, Nyoman Sri Handayani², Putu Diah Darmayanti¹

¹Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Bali Internasional, Jalan Seroja Gang Jeruk No. 9A Tonja, Denpasar 80111, Indonesia,

²Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Jalan PB.Sudirman, Denpasar 80225, Indonesia

Penulis korespondensi:

Ni Putu Senshi Septiasari
(senshisepia@unbi.ac.id)

Diterima: November 2024

Disetujui: Maret 2025

Sitasi:

Septiasari NPS, Dwijastuti NMS, Handayani NS, Darmayanti PD. 2025. Desain primer secara *in silico* dan optimasi PCR untuk deteksi gen penyandi *ovary ecdysteroidogenic hormone* (OEH) pada nyamuk *Aedes aegypti* yang terinfeksi *Wolbachia*. *Jurnal Entomologi Indoensia*. 22(1):9–16. DOI: <https://doi.org/10.5994/jei.22.1.9>

ABSTRAK

Nyamuk *Aedes aegypti* (Linnaeus) betina ber-*Wolbachia* dilaporkan memiliki perubahan tingkah laku saat perkawinan dan menghisap darah. Gen penyandi *ovary ecdysteroidogenic hormone* (OEH) merupakan hormon yang dilepaskan pada saat nyamuk betina mengkonsumsi darah sehingga berpengaruh terhadap pembentukan telur. Studi awal mengenai genetika nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* sangat diperlukan untuk dapat membantu pengendalian vektor dengue. Metode *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan metode yang tepat digunakan untuk studi genetika. Desain primer merupakan tahapan awal dan krusial dalam studi genetika karena perancangan primer yang spesifik akan menentukan keberhasilan proses PCR. Tujuan penelitian ini adalah melakukan perancangan primer secara *in silico* untuk mendesain primer gen OEH serta menguji optimalisasi primer yang dirancang untuk dapat mengamplifikasi daerah gen OEH secara *in vitro*. Penelitian ini meliputi beberapa tahapan, yaitu tahapan *in silico* dengan melakukan desain primer, *BLAST* primer, uji kualitas primer, dan melakukan simulasi PCR secara *in silico*. Primer hasil rancangan diuji secara *in vitro* dengan melakukan PCR dengan menggunakan berbagai variasi konsentrasi primer (0,2 μ M dan 0,4 μ M) dan suhu *annealing* (mulai dari suhu 45 °C sampai suhu 60 °C). Hasil penelitian mendapatkan desain primer yang spesifik pada daerah target, yaitu primer OEH 8 dan OEH 9. Hasil uji *in silico* memperoleh ukuran produk DNA, yaitu 264 pb untuk primer OEH 8 dan 236 pb untuk primer OEH 9, serta efisiensi PCR kedua primer, yaitu 95%. Hasil uji secara *in vitro* menunjukkan hanya primer OEH 9 yang memenuhi kriteria primer sesuai uji *in silico*, yaitu konsentrasi primer 0,4 μ M dengan suhu *annealing* 57 °C.

Kata kunci: amplifikasi, konsentrasi primer, PCR, suhu *annealing*

ABSTRACT

Female *Aedes aegypti* (Linnaeus) mosquitoes bearing *Wolbachia* are reported to have behavioral changes during mating and blood-sucking. The ovary ecdysteroidogenic hormone (OEH) is a hormone released when female mosquitoes consume blood so that it influences egg formation. Initial studies regarding the genetics of the *A. aegypti* mosquito carrying *Wolbachia* are very necessary to be able to do this help control dengue vectors. The polymerase chain reaction (PCR) method is an appropriate method for genetic studies. Primer design is an initial and crucial stage in genetic studies because designing specific primers will determine the success of the PCR process. This research includes several stages of *in silico* primer design to design OEH gene primers and test the optimization of the *in vitro* designed primers. The *in silico* stage which involves primer design, primer *BLAST*, primer quality testing, and *in silico* PCR simulations. The designed primers were tested *in vitro* by performing PCR using various variations in primer concentration (0.2 μ M and 0.4 μ M) and annealing temperature (start from 45 °C to 60 °C). The results obtained *in silico* were two pairs of primers: primers OEH 8 and OEH 9. The results of

the in silico test obtained a DNA product size of 264 bp for Primer OEH 8 and 236 bp for primer OEH 9, and the PCR efficiency was 95%. The results of the in vitro test showed only primer OEH 9 met the primer criteria according to the in silico test: primer concentration of 0.4 μ M with an annealing temperature of 57 °C.

Key words: annealing temperature, amplification, PCR, primer concentration

PENDAHULUAN

Penyakit demam dengue (DD) merupakan penyakit endemik di wilayah tropis dan subtropis. Pengembangan strategi baru dengan memanfaatkan teknologi terkini telah dilakukan untuk mengendalikan transmisi virus dengue, yaitu pemanfaatan bakteri endosimbiotik *Wolbachia* (Saraswati et al. 2023). Potensi penerapan bakteri simbiosis *Wolbachia* merupakan upaya untuk pengendalian penyakit dengue melalui penyebaran vektor dengan senjata alami (Iturbe-Ormaetxe et al. 2011). Bakteri ini secara alami ditemukan pada 50% spesies arthropoda, isopoda, serta nematoda dan dinyatakan aman untuk manusia, hewan, dan lingkungan sekitarnya (Zhou et al. 2016; Werren et al. 2008). Pengembangan strategi pengendalian DD telah dilakukan dengan memanfaatkan bakteri endosimbiotik *Wolbachia* yang diinfeksi ke nyamuk *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Walker et al. 2011; Buchori et al. 2022; Ye et al. 2015). Inovasi teknologi *Wolbachia* terbukti efektif di 14 negara serta telah diakui oleh WHO sebagai teknologi pengendalian vektor dengue (Buchori et al. 2022). Sementara di Indonesia efektifitas teknologi *Wolbachia* ini terbukti menurunkan kasus dengue 77% dan penurunan pasien rawat inap sebanyak 86% di Yogyakarta (Buchori et al. 2022).

Dampak kehadiran *Wolbachia* di dalam tubuh nyamuk *A. aegypti* berakibat pada perubahan tingkah laku nyamuk betina dalam menghisap darah sehingga menyebabkan ketidaknormalan reproduksi dan berdampak pada kelangsungan hidup telur dan larva nyamuk (Irfandi 2018; McMeniman 2010; Crain et al. 2011). Dampak yang perlu diperhatikan juga adalah adanya ketidakmampuan nyamuk dalam bertahan hidup di alam liar yang akan menyebabkan proses pelepasan nyamuk *Wolbachia* oleh pemerintah harus disokong secara terus menerus (Irfandi 2018). Kajian genetika perlu dilakukan mengingat kemampuan nyamuk *Wolbachia* di alam belum banyak diketahui dari aspek genetika. Gen *neurotranscriptome* penyandi *ovary ecdysteroidogenic hormone* (OEH) merupakan gen yang dapat dijadikan acuan studi genetika nyamuk untuk mengetahui perubahan perilaku nyamuk betina, seperti perkawinan dan kemampuan mengkonsumsi darah serta merupakan area studi intensif bagi pengendalian vektor (Matthews et al. 2016). Hormon ini dilepaskan

oleh otak pada saat nyamuk betina mengkonsumsi darah sehingga merangsang pembentukan telur (Gulia-Nuss et al. 2015). Studi genetika ini merupakan studi pendahuluan untuk dapat membantu kajian dalam aspek pengendalian vektor DD.

Penelitian terdahulu telah dilakukan oleh beberapa ahli yang mengangkat studi atau kajian tentang nyamuk *A. aegypti* yang terinfeksi *Wolbachia*, yaitu dampak perubahan perilaku nyamuk serta perubahan fenotipe nyamuk (Iturbe-Ormaetxe et al. 2011; Irfandi 2018). Sementara kajian genetika telah banyak dilakukan pada nyamuk *A. aegypti* alami, seperti ditemukannya pengaruh *steroidogenic neurohormone* pada nyamuk betina dan ditemukannya sekuen penyandi OEH (Gulia-Nuss et al. 2015; Brown et al. 1998). Hormon tersebut berpengaruh terhadap perilaku nyamuk betina dalam menghisap darah dan reproduksi telur. Namun, kajian genetika mengenai perubahan perilaku nyamuk *A. aegypti* yang terinfeksi *Wolbachia* masih tergolong baru khususnya yang berpengaruh terhadap perubahan perilaku mengisap darah dan reproduksi nyamuk yang berkaitan dengan hormon OEH. Perancangan primer diperlukan sebagai penelitian pendahuluan mengenai studi genetika gen OEH serta menguji primer tersebut untuk mendapatkan kondisi optimal sehingga dapat menghasilkan produk PCR yang baik.

Metode *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan metode yang umum digunakan untuk studi genetika. Metode PCR merupakan metode amplifikasi DNA secara enzimatis dengan bantuan enzim polimerase (Borah 2011). Desain primer merupakan tahapan yang sangat krusial dalam studi genetika karena perancangan primer yang spesifik akan menentukan keberhasilan proses PCR (Deratih & Achya 2021). Uji *in silico* merupakan uji secara bioinformatika yang dapat diuji kebenarannya. Penelusuran secara *in silico* juga akan memudahkan para peneliti untuk mengetahui kemungkinan resiko yang akan didapatkan sebelum mulai pada penelitian *in vitro*. Oleh karena itu, uji *in silico* sangat penting untuk dilakukan terutama pada penelitian beresiko tinggi, seperti desain primer yang akan dilakukan dengan menggunakan metode PCR (Parikesit et al. 2017). Tujuan penelitian ini adalah melakukan rancangan primer gen OEH secara *in silico* dan mengetahui kondisi optimal primer yang dirancang

untuk dapat menghasilkan amplifikasi pada daerah gen OEH secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Desain primer gen penyandi OEH dan uji kualitas primer secara *in silico*

Desain primer menggunakan *website* National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses pada laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Cetakan DNA *A. aegypti* diperoleh dari penelusuran protein OEH dari GenBank NCBI dengan nomor akses U69542.1. Kandidat pasangan primer ditunjukkan pada laman *pick primer* pada program NCBI. Kandidat primer yang dipilih, diuji secara *in silico* dengan *software* FastPCR. Uji *in silico* meliputi perkiraan lokasi penempelan primer, pemilihan nilai *melting temperature* (T_m), presentase kandungan jumlah basa G (guanin) dan C (sitosin) (GC%), adanya *soft 3' complementarity*, dan perkiraan ukuran produk PCR (Pradnyaniti & Yowani 2013; Sasmitha et al. 2018).

Optimasi primer gen OEH secara *in vitro* dengan metode PCR

Persiapan, lokasi, dan waktu penelitian. Penelitian telah lolos kajian etik di Poltekkes Kemenkes Denpasar dengan Nomor Persetujuan Etik: DP.04.02/F.XXXII.25/0664/2024. Sampel nyamuk *A. aegypti* betina dikoleksi di dua tempat, yaitu nyamuk *A. aegypti wild type* dikoleksi di Unit Laboratorium Biomedik Terpadu, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana dan nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* dikoleksi di Labkesmas Kesehatan Lingkungan Salatiga pada bulan Mei–Agustus 2024.

Pelaksanaan penelitian secara *in vitro*. Sampel nyamuk diambil dengan *purposive sampling*. Sebanyak 20 individu nyamuk diekstraksi dengan DNA Extraction and Purification KIT (Qiagen). Sampel nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* di konfirmasi kembali dengan menggunakan protokol *skrining Wolbachia* dengan metode *real time* PCR Taqman Assay (WMP Protocol). Setelah konfirmasi amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer OEH yang dirancang. Optimasi primer dilakukan dengan beberapa kombinasi variasi formula PCR dan variasi program PCR.

a. Formula PCR

Optimasi formula PCR dilakukan dengan komposisi campuran PCR Mix (*Go Taq Green Master Mix* PCR Promega) 1X, DNA 25 ng/ul dan konsentrasi primer dengan variasi 0,2 μ M dan 0,4 μ M.

b. Program PCR

PCR dijalankan pada mesin Thermo Cycler/mesin

PCR merk Veriti. Program PCR yang dijalankan, yaitu tahapan denaturasi 30 detik pada suhu 94 °C, tahapan *annealing* divariasikan dimulai dari suhu 45 °C sampai 60 °C selama 30 detik, dan tahapan *extension* selama 30 detik dengan suhu 72 °C. Program ini diulang sebanyak 35 kali.

Tahap visualisasi produk PCR dilakukan dengan teknik elektroforesis pada konsentrasi gel agarosa 1,5%. Hasil elektroforesis kemudian dilihat dengan menggunakan Gel-Doc (Biorad) (Septiasari 2022). Interpretasi hasil dan analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif dengan melihat kualitas pita DNA. Perhitungan ukuran pita DNA diketahui dengan membuat grafik semilog dan di konfirmasi dengan pengolahan grafik logaritma (Anam et al. 2021). Ukuran pita DNA yang didapatkan dikonfirmasi dengan bank data dari pengujian PCR *in silico*.

HASIL

Kualitas primer secara *in silico*

Desain primer secara *in silico* didapatkan gen penyandi OEH memiliki panjang basa sekitar 973 basa. Berdasarkan hasil desain primer menggunakan analisis *pick primer* pada *website* NCBI, didapatkan 10 kandidat pasangan primer. Pasangan primer OEH 8 dan OEH 9 merupakan primer yang sesuai dengan posisi gen yang diinginkan. Posisi primer OEH 8 memiliki pada basa 82–345, sedangkan primer OEH 9 berada pada posisi 326–561. Uji primer secara *in silico* dan PCR *in silico* dilakukan dengan *software* FastPCR. Hasil uji menunjukkan kedua pasangan primer memiliki efisiensi 95% dengan perkiraan produk PCR, yaitu 264 pb untuk primer OEH 8 dan 236 pb untuk primer OEH 9 (Tabel 1).

Hasil optimasi primer OEH secara *in vitro*

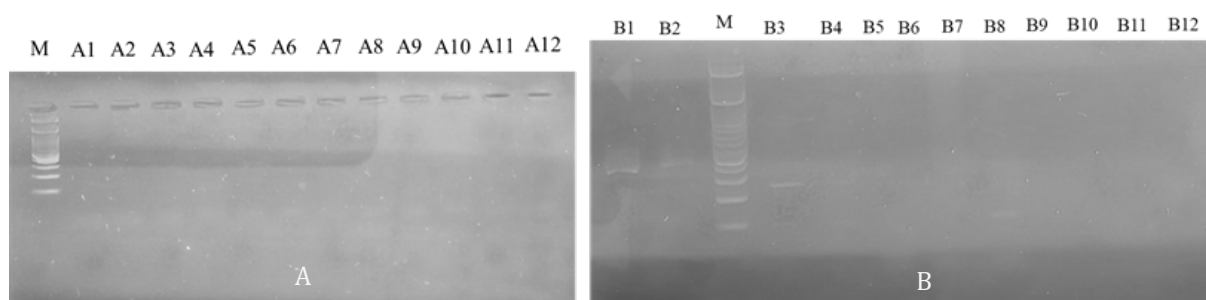
Hasil optimasi primer OEH 8 pada nyamuk *A. aegypti wild type* menunjukkan tidak adanya amplifikasi pada konsentrasi primer 0,2 μ M, sedangkan pada konsentrasi primer 0,4 μ M, amplifikasi ditunjukkan pada suhu *annealing* 45 °C, 46 °C, 47 °C, dan 48 °C. Suhu *annealing* yang optimal terdapat pada suhu 47 °C yang ditandai dengan pita yang jelas dan spesifik (Gambar 1). Nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* menunjukkan adanya amplifikasi pada konsentrasi primer 0,4 μ M dengan suhu *annealing* yang rendah, yaitu 45 °C. Namun, hasil visualisasi tidak spesifik karena ukuran pita DNA yang dihasilkan lebih dari 1000 pb (Gambar 2 dan Tabel 2).

Hasil optimasi primer OEH 9 pada nyamuk *A. aegypti wild type* maupun *A. aegypti* ber-*Wolbachia* menunjukkan amplifikasi pada konsentrasi primer 0,4 μ M pada suhu *annealing* 47 °C, 49 °C, 51 °C, 53 °C,

Tabel 1. Hasil *polymerase chain reaction* (PCR) secara *in silico***Table 1.** *In silico* *polymerase chain reaction* (PCR) results

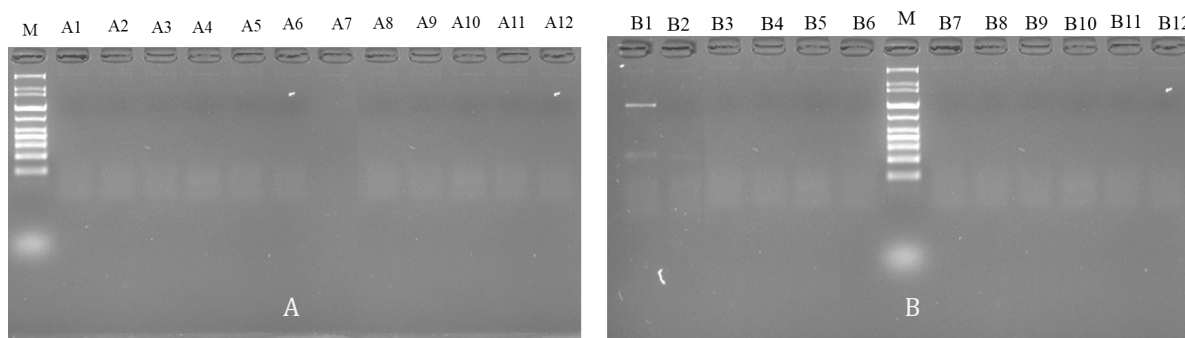
Nama primer (Primer name)	Panjang (Length)	Lokasi (Location)	T _m	GC%	Self 3' complemen- tarity	Organisme yang diprediksi (Primer blast predicted organism)	Efisiensi PCR primer (Primer PCR efficiency)	Amplikon (pb)
OEH8-F	20	82	59,82	55,0	1,00	<i>Aedes aegypti</i>	95%	264
OEH8-R	20	345	59,82	55,0	1,00			
OEH9-F	20	326	59,82	55,0	0,00	<i>A. aegypti</i>	95%	236
OEH9-R	20	561	59,76	55,0	0,00	<i>Aedes albopictus</i>		

T_m: melting temperature; pb: pasang basa (base pair); OEH: ovary ecdysteroidogenic hormone; GC%: persentase kandungan jumlah basa guanin (G) dan sitosin (C) (Percentage of guanine(G) and cytosine(C) bases).



Gambar 1. Optimasi primer OEH 8 pada *Aedes aegypti* wild type. Gambar merupakan kombinasi variasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang berbeda. A: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,2 μM; B: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,4 μM dengan keterangan suhu A1/B1: 45 °C; A2/B2: 46 °C; A3/B3: 47 °C; A4/B4: 48 °C; A5/B5: 49 °C; A6/B6: 50 °C; A7/B7: 53 °C; A8/B8: 56 °C; A9/B9: 57 °C; A10/B10: 58 °C; A11/B11: 59 °C; dan A12/B12: 60 °C.

Figure 1. OEH 8 Primer optimization in wild type *Aedes aegypti*. The figure above combines variations in annealing temperature and different primer concentrations. A: is a combination of a primary concentration of 0.2 μM and B: is a combination of a primary concentration of 0.4 μM with a temperature of A1/B1: 45 °C; A2/B2: 46 °C; A3/B3: 47 °C; A4/B4: 48 °C; A5/B5: 49 °C; A6/B6: 50 °C; A7/B7: 53 °C; A8/B8: 56 °C; A9/B9: 57 °C; A10/B10: 58 °C; A11/B11: 59 °C; and A12/B12: 60 °C.



Gambar 2. Optimasi primer OEH 8 pada *Aedes aegypti* ber-Wolbachia. Gambar di atas merupakan kombinasi variasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang berbeda. A: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,2 μM dan B: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,4 μM dengan keterangan suhu A1/B1: 45 °C; A2/B2: 46 °C; A3/B3: 47 °C; A4/B4: 48 °C; A5/B5: 49 °C; A6/B6: 50 °C; A7/B7: 53 °C; A8/B8: 56 °C; A9/B9: 57 °C; A10/B10: 58 °C; A11/B11: 59 °C; dan A12/B12: 60 °C.

Figure 2. OEH 8 Primer optimization in *Aedes aegypti* bearing Wolbachia. The figure above combines variations in annealing temperature and different primer concentrations. A: is a combination of a primary concentration of 0.2 μM and B: is a combination of a primary concentration of 0.4 μM with a temperature of A1/B1: 45 °C; A2/B2: 46 °C; A3/B3: 47 °C; A4/B4: 48 °C; A5/B5: 49 °C; A6/B6: 50 °C; A7/B7: 53 °C; A8/B8: 56 °C; A9/B9: 57 °C; A10/B10: 58 °C; A11/B11: 59 °C; and A12/B12: 60 °C.

55 °C, 57 °C, dan 59 °C. Optimasi primer OEH 9 pada kedua nyamuk mendapatkan hasil yang spesifik pada konsentrasi 0,4 µM dengan suhu *annealing* 57 °C (Tabel 3, Gambar 3, Gambar 4).

PEMBAHASAN

Hasil penelusuran dengan *GenBank* ditemukan gen penyandi OEH memiliki panjang total sebesar 973 pb.

Desain primer secara *in silico* pada daerah gen penyandi *ovary ecdysteroidogenic hormone* (OEH) dengan *software* NCBI, ditemukan sebanyak 10 pasang kandidat primer yang mengamplifikasi daerah gen OEH. Dua kandidat pasangan primer terbaik dilakukan pengujian secara *in silico* dengan melakukan uji kualitas primer dan *in silico* PCR dengan *software* FastPCR. Primer OEH 8 dan primer OEH 9 ditentukan menjadi

Tabel 2. Optimasi primer OEH 8

Table 2. OEH 8 primer optimization

Variasi suhu <i>annealing</i> pada PCR (<i>Annealing temperature variations on PCR</i>)	Konsentrasi primer (<i>Primer concentration</i>) (<i>Aedes aegypti wild type</i>)		Keterangan (<i>Information</i>)	Konsentrasi primer (<i>Primer concentration</i>) (<i>Aedes aegypti ber-Wolbachia</i> (<i>A. aegypti bearing Wolbachia</i>))		Keterangan (<i>Information</i>)
	0,2 µM	0,4 µM		0,2 µM	0,4 µM	
45 °C	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)
46 °C	-	+	Tidak spesifik(<i>Unspecific</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
47 °C	-	+	Spesifik (<i>Specific</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
48 °C	-	+	Lemah (<i>Weak</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
49 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
50 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
53 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
56 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
57 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
58 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
59 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
60 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)

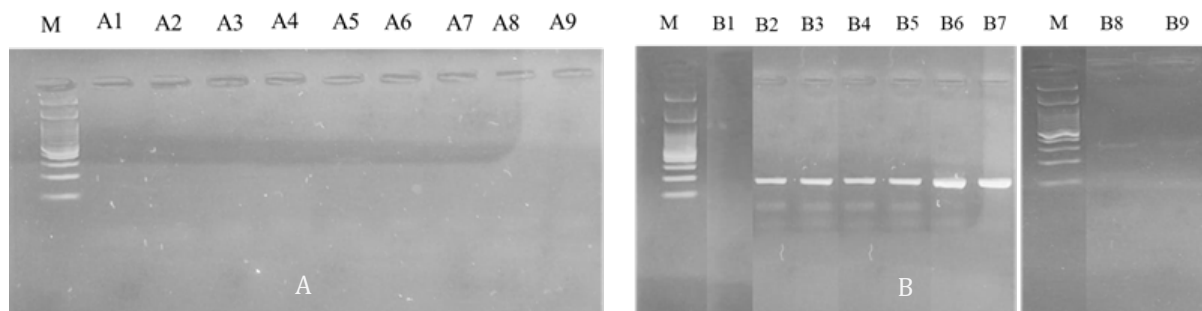
PCR: *polymerase chain reaction*; OEH: *ovary ecdysteroidogenic hormone*.

Tabel 3. Optimasi primer OEH 9

Table 3. OEH 9 primer optimization

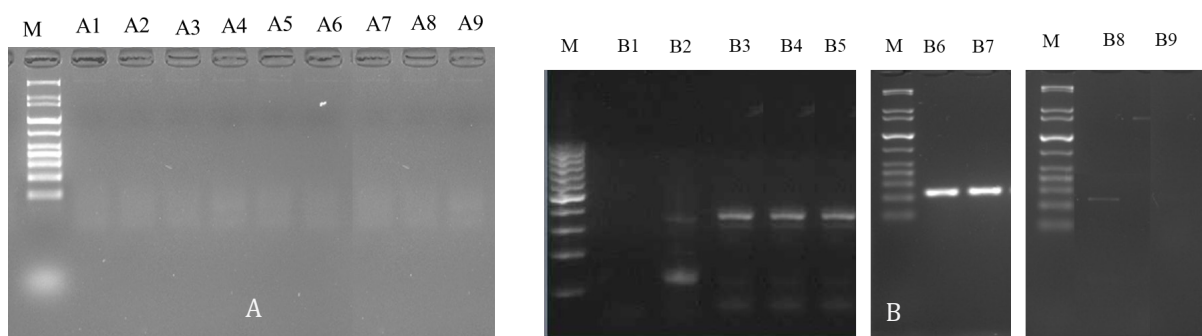
Variasi suhu <i>annealing</i> pada PCR (<i>Annealing temperature variations on PCR</i>)	Konsentrasi primer (<i>Primer concentration</i>) (<i>Aedes aegypti wild type</i>)		Keterangan (<i>Information</i>)	Konsentrasi primer (<i>Primer concentration</i>) (<i>Aedes aegypti ber-Wolbachia</i> (<i>A. aegypti bearing Wolbachia</i>))		Keterangan (<i>Information</i>)
	0,2 µM	0,4 µM		0,2 µM	0,4 µM	
45 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)
47 °C	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)
49 °C	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)
51 °C	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)
53 °C	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)
55 °C	-	+	Tidak spesifik (<i>Unspecific</i>)	-	+	Spesifik (<i>Specific</i>)
57 °C	-	+	Spesifik (<i>Specific</i>)	-	+	Spesifik (<i>Specific</i>)
59 °C	-	+	Lemah (<i>Weak</i>)	-	+	Lemah (<i>Weak</i>)
60 °C	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)	-	-	Tidak ada pita (<i>No band</i>)

PCR: *polymerase chain reaction*; OEH: *ovary ecdysteroidogenic hormone*.



Gambar 3. Optimasi primer OEH 9 pada *Aedes aegypti* wild type. Gambar merupakan kombinasi variasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang berbeda. A: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,2 μ M dan B: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,4 μ M dengan keterangan suhu A1/B1: 45 °C; A2/B2: 47 °C; A3/B3: 49 °C; A4/B4: 51 °C; A5/B5: 53 °C; A6/B6: 55 °C; A7/B7: 57 °C; A8/B8: 59 °C; dan A9/B9: 60 °C.

Figure 3. OEH 9 primer optimization in wild type *Aedes aegypti*. The figure above combines variations in *annealing* temperature and different primer concentrations. A: is a combination of a primary concentration of 0.2 μ M and B: is a combination of a primary concentration of 0.4 μ M with a temperature of A1/B1: 45 °C; A2/B2: 47 °C; A3/B3: 49 °C; A4/B4: 51 °C; A5/B5: 53 °C; A6/B6: 55 °C; A7/B7: 57 °C; A8/B8: 59 °C; and A9/B9: 60 °C.



Gambar 4. Optimasi primer OEH 9 pada *Aedes aegypti* ber-*Wolbachia*. Gambar diatas merupakan kombinasi variasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang berbeda. A: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,2 μ M dan B: merupakan kombinasi konsentrasi primer 0,4 μ M dengan keterangan suhu A1/B1: 45 °C; A2/B2: 47 °C; A3/B3: 49 °C; A4/B4: 51 °C; A5/B5: 53 °C; A6/B6: 55 °C; A7/B7: 57 °C; A8/B8: 59 °C; dan A9/B9: 60 °C.

Figure 4. OEH 9 Primer optimization in *Aedes aegypti* bearing *Wolbachia*. The figure above combines variations in *annealing* temperature and different primer concentrations. A: is a combination of a primary concentration of 0.2 μ M and B: is a combination of a primary concentration of 0.4 μ M with a temperature of A1/B1: 45 °C; A2/B2: 47 °C; A3/B3: 49 °C; A4/B4: 51 °C; A5/B5: 53 °C; A6/B6: 55 °C; A7/B7: 57 °C; A8/B8: 59 °C; dan A9/B9: 60 °C.

kandidat primer untuk penyandi daerah gen OEH (Tabel 1). Penentuan primer yang optimal memenuhi kriteria penentuan primer, yaitu mewakili lokasi amplifikasi pada wilayah target, panjang oligonukleotida primer yang ideal, nilai *temperature melting* (T_m), persentase nilai GC, dan kemungkinan kemunculan dimer antar primer (Septiasari 2022).

Primer OEH 8 merupakan pasangan primer yang terpilih karena memiliki lokasi penempelan pada basa ke 82 sampai basa ke 345 dari gen OEH, sedangkan primer OEH 9 memiliki lokasi ke 326 sampai 561. Maka, diperkirakan mewakili sebagian besar wilayah OEH yang memiliki total panjang 973 pb.

Proses amplifikasi memerlukan primer yang spesifik agar dapat menghasilkan produk PCR yang ideal. Jumlah nukleotida yang membentuk primer juga sangat berpengaruh terhadap proses amplifikasi. Menurut Sasmitha (2018), panjang primer berkisar 18–

30 oligonukleotida. Jika kurang dari 18 oligonukleotida maka akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada tempat yang tidak spesifik, namun jika lebih dari 30 basa maka antar primer akan terjadi proses hibridasi dan akan menghambat terjadinya amplifikasi DNA (Sasmitha et al. 2018).

Nilai T_m adalah suhu saat untai ganda DNA terpisah sebanyak 50%. Nilai T_m yang optimal berkisar 50–65 °C, sedangkan selisih antar primer yang direkomendasikan paling banyak sekitar 5 °C. Jika suhu T_m terlalu tinggi akan mempengaruhi proses amplifikasi DNA, namun jika terlalu rendah akan mengakibatkan munculnya *unspecific product* akibat dari penempelan primer pada sekuen yang tidak diinginkan (Pradnyaniti & Yowani 2013).

Persentase jumlah G-C merupakan persentase banyaknya basa guanin dan sitosin pada primer. Persentase G-C yang optimal berada pada rentang 40–

60%. Persentase G-C dapat mempengaruhi Tm suatu primer dan dapat mempengaruhi suhu pemisahan rantai ganda primer dan DNA template (Sasmitha et al. 2018). Sementara, primer dengan persentase G-C yang rendah dapat menurunkan efisiensi proses PCR (Borah 2011; Sasmito et al. 2014). Kemungkinan munculnya dimer antar primer juga mempengaruhi penentuan pasangan primer. Dimer pada ujung 3' primer sebaiknya tidak lebih dari 3 basa karena akan mempengaruhi spesifisitas dari primer (Pradnyaniti & Yowani 2013).

Primer OEH 9 memiliki kondisi optimal untuk menghasilkan amplifikasi pada konsentrasi primer 0,4 μ M dengan suhu *annealing* 57 °C. Kondisi ini ditentukan berdasarkan analisis tahapan elektroforesis menghasilkan pita DNA *single band* yang spesifik (Tabel 3). Konsentrasi primer sangat menentukan keberhasilan proses amplifikasi karena konsentrasi yang optimal akan menghasilkan gambaran amplifikasi yang jelas dan spesifik. Konsentrasi primer yang terlalu rendah mengakibatkan proses amplifikasi tidak terjadi. Hal tersebut terjadi akibat tidak cukupnya kuantitas primer dalam menjalankan proses PCR, namun jika konsentrasi terlalu tinggi menyebabkan adanya template DNA belum teramplifikasi secara sempurna menyebabkan pita DNA yang tipis dan samar (Setyawati & Zubaidah 2021).

Selain konsentrasi primer, suhu *annealing* merupakan faktor penentu dari optimasi primer karena berpengaruh terhadap program PCR yang dapat menghasilkan hasil amplifikasi yang baik. Suhu *annealing* yang tinggi menyebabkan ikatan hidrogen antara basa nitrogen pada primer dan *template* DNA menjadi lemah sehingga primer tidak dapat menempel dengan kuat dan spesifik. Suhu *annealing* yang terlalu rendah juga dapat menyebabkan hasil amplifikasi tidak optimal karena primer akan menempel tidak hanya pada DNA target dan mengakibatkan hasil amplifikasi tidak spesifik (Sasmito et al. 2014).

Hasil optimasi primer OEH 8 pada nyamuk *A. aegypti wild type* dan *A. aegypti* ber-*Wolbachia* (Tabel 2) mendapatkan hasil yang berbeda, yaitu primer OEH 8 pada sampel *A. aegypti* ber-*Wolbachia* menunjukkan adanya amplifikasi pada suhu rendah, yaitu 45 °C pada konsentrasi 0,4 μ M. Berdasarkan uji *in silico* ukuran ampikon PCR pada primer OEH 8 sekitar 264 pb, namun pada hasil elektroforesis menunjukkan ukuran panjang ampikon sebesar lebih dari 1000 pb sehingga diperkirakan gen yang teramplifikasi bukan gen OEH 8. Pada *A. aegypti wild type* ditunjukkan hasil optimal pada proses PCR pada konsentrasi 0,4 μ M dengan suhu *annealing* 47 °C, sedangkan pada sampel nyamuk *A. aegypti* ber-*Wolbachia* tidak mendapatkan produk

amplifikasi. Dugaan sementara primer OEH 8 dapat membedakan nyamuk *A. aegypti wild type* dengan *A. aegypti* ber-*Wolbachia*, tetapi pernyataan ini perlu dilakukan konfirmasi lebih lanjut dengan pendekatan analisis mutasi DNA pada *A. aegypti* ber-*Wolbachia* dengan teknik *sekuensing*.

Tahapan *in silico* merupakan tahapan yang dapat memprediksi minimalisir kesalahan pada saat melakukan PCR secara *in vitro* (Parikesit et al. 2017). Pada penelitian ini, desain primer dan uji primer secara *in silico* dapat memprediksi ukuran produk DNA, lokasi penempelan primer, dan efisiensi PCR primer. Primer OEH 8 dan OEH 9 yang didesain telah memenuhi persyaratan uji primer. Namun, hanya primer OEH 9 yang didesain ini dapat mengamplifikasi wilayah target dengan tepat sesuai yang telah dirancang secara *in silico*. Hal ini menunjukkan bahwa primer OEH 9 yang didesain sudah cukup baik untuk dapat digunakan dalam proses PCR dan dapat menghasilkan produk sesuai dengan rentang daerah yang diinginkan.

KESIMPULAN

Hasil rancangan primer gen OEH secara *in silico* adalah primer OEH 8 dan OEH 9 dengan ukuran produk PCR, yaitu 264 pb untuk primer OEH 8 dan 236 pb untuk primer OEH 9, serta nilai efisiensi PCR kedua primer, yaitu 95%. Sementara, kondisi primer optimal hanya ditunjukkan oleh primer OEH 9 dengan konsentrasi primer 0,4 μ M dengan suhu *annealing* 57 °C.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Direktorat Jenderal Pendidikan Vokasi atas pendanaan BOPTN Program Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Dosen Vokasi Tahun Anggaran 2024 dengan nomor: 0520/D4/AL.04/2024. Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada para kolega di Laboratorium Biomedik Terpadu FK Universitas Udayana dan Labkesmas Kesehatan Lingkungan Salatiga yang membantu penyediaan sampel pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anam K, W Cahyadi, I Azmi, K Senjarini, R Oktarianti. 2021. Analisis hasil elektroforesis DNA dengan *image processing* menggunakan metode *gaussian filter*, *Indonesian Journal of Electronics and Instrumentation Systems*. 11:37–48. DOI: <https://doi.org/10.22146/ijeis.58268>.
- Borah P. 2011. Primer designing for PCR. *Science Vision*. 11:134–136.
- Buchori D, Mawan A, Nurhayati I, Aryati A, Kusnanto H, Hadi UK. 2022. Risk assessment on the release of *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* in Yogyakarta, Indonesia. *Insects*. 13:924. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13100924>.

- Brown MR, Graf R, Swiderek KM, Fendley D, Stracker TH, Champagne DE. 1998. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. *Journal of Biological Chemistry*. 273:3967–3971.
- Crain PR, Mains JW, Suh E, Huang Y, Crowley PH, Dobson SL. 2011. Wolbachia infections that reduce immature insect survival: Predicted impacts on population replacement. *BMC Evolutionary Biology*. 11:290. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-290>.
- Deratih BP, Achyar A. 2021. Primer design and in silico PCR for detection *Shigella* sp. on refilled water samples. *Serambi Biologi*. 6:1–6.
- Gulia-Nuss M, Elliot A, Brown MR, Strand MR. 2015. Multiple factors contribute to anautogenous reproduction by the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 82:8–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.08.001>.
- Irfandi A. 2018. Kajian pemanfaatan *Wolbachia* terhadap pengendalian DBD (studi literatur dan studi kasus pemanfaatan *Wolbachia* di Yogyakarta). *Forum Ilmiah*. 15:276–89.
- Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*. 12:508–518. DOI: <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>.
- Matthews BJ, McBride CS, DeGennaro M, Despo O, Vossall LB. 2016. The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics*. 17:32. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2239-0>.
- McMeniman CJ, O'Neill SL. 2010. A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 13:748. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000748>.
- McMeniman CJ, Lane R V., Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF. 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*. 323:141–144. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1165326>.
- Parikesit, AA, Anugoro D, Putranto RA. 2017. Pemanfaatan bioinformatika di bidang pertanian dan kesehatan. *Menara Perkebunan*. 85:105–115. DOI: <https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v85i2.237>.
- Pradnyaniti DG, Yowani S. 2013. Desain primer secara *in silico* untuk amplifikasi fragmen gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* dengan *polymerase chain reaction* (PCR). *Jurnal Farmasi Udayana*. 2:124–127.
- Saraswati U, Supriyati E, Rahayu A, Rovik A, Kurniasari I, Hermantara R. 2023. Kajian aspek keamanan nyamuk *Aedes aegypti* Linnaeus ber-*Wolbachia* di Yogyakarta, Indonesia. *Jurnal Entomologi Indonesia*. 20:117–128. DOI: <https://doi.org/10.5994/jei.20.2.117>.
- Sasmitha VL, Sanna Yustiantara P, Sagung Chandra Yowani. 2018. Desain DNA primer secara *in silico* sebagai pendeteksi mutasi gen *gyrA* *Mycobacterium tuberculosis* untuk metode *polymerase chain reaction*. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*. 6:63–69.
- Sasmito DEK, Kurniawan R, Muhimmah I. 2014. Karakteristik primer pada *polymerase chain reaction* (PCR) untuk sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*. V:93–102.
- Septiasari NPS. 2022. Optimasi PCR dengan penanda daerah D-loop DNA mitokondria untuk metode tes DNA. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*. 12:76–83. DOI: <https://doi.org/10.24843/IJLFS.2022.v12.i02.p03>.
- Setyawati R, Zubaidah S. 2021. Optimasi konsentrasi primer dan suhu *annealing* dalam mendeteksi gen leptin pada sapi peranakan ongole (PO) menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*. 4:36–40. DOI: <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ. 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 476:450–453. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10355>.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. 6:741–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>.
- Ye YH, Carrasco AM, Frentiu FD, Chenoweth SF, Beebe NW, van den Hurk AF. 2015. *Wolbachia* reduces the transmission potential of dengue-infected *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9:e0003894. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003894>.
- Zhou XF, Li ZX. 2016. Establishment of the cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* strain wMel in an important agricultural pest insect. *Scientific Reports*. 6:39200. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep39200>.