

PRIMARY OPTIMATION FOR *Wolbachia* sp. DETECTION IN DRAGONFLIES (*Orthetrum sabina*)

OPTIMASI PRIMER UNTUK DETEKSI BAKTERI *Wolbachia* sp. PADA CAPUNG (*Orthetrum sabina*)

Muhammad Naufal Arrafi¹, Yuni Ahda², Siska Alicia Farma³, Yusni Atifah⁴

^{1,2,3,4} Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: ahdayuni@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Wolbachia sp. is an endosymbiont bacterium that is widely distributed in various insect species, including dragonflies, and is known to manipulate the reproductive biology of its host. Detection and identification of *Wolbachia* in dragonflies is important to understand its role in insect ecology and its potential application in disease vector control. This study aimed to optimize specific primers for *Wolbachia* sp. detection in dragonflies using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Dragonfly samples were collected and isolated using GeneJET PCR Purification Kit, followed by amplification of *Wolbachia* target gene using Wolbf (forward) and Wespcr (reverse) primers. The optimization process included adjustment of reagent concentration, PCR conditions, as well as validation of results through electrophoresis and bioinformatics analysis using Primer-BLAST. The results showed that the optimized PCR protocol was able to detect the presence of *Wolbachia* in dragonfly tissues sensitively and specifically. These findings provide an important basis for further studies on the distribution, diversity and role of *Wolbachia* in dragonflies, and support the development of endosymbiont-based biocontrol strategies in insect vectors.

Key words *Bioinformatics analysis, Dragonfly, PCR optimization, Polymerase Chain Reaction (PCR), Wolbachia sp.*

Abstrak

Wolbachia sp. merupakan bakteri endosimbion yang tersebar luas pada berbagai spesies serangga, termasuk capung, dan dikenal mampu memanipulasi biologi reproduksi inangnya. Deteksi dan

identifikasi *Wolbachia* pada capung sangat penting untuk memahami peranannya dalam ekologi serangga serta potensi aplikasinya pada pengendalian vektor penyakit. Penelitian ini bertujuan mengoptimasi primer spesifik untuk deteksi *Wolbachia* sp. pada capung menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Sampel capung dikoleksi dan diisolasi DNA-nya menggunakan GeneJET PCR Purification Kit, dilanjutkan dengan amplifikasi gen target *Wolbachia* menggunakan primer Wolbf (forward) dan Wespqr (reverse). Proses optimasi meliputi penyesuaian konsentrasi reagen, kondisi PCR, serta validasi hasil melalui elektroforesis dan analisis bioinformatika menggunakan Primer-BLAST. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protokol PCR yang dioptimasi mampu mendeteksi keberadaan *Wolbachia* pada jaringan capung secara sensitif dan spesifik. Temuan ini memberikan dasar penting bagi studi lebih lanjut mengenai distribusi, keragaman, dan peran *Wolbachia* pada capung, serta mendukung pengembangan strategi biokontrol berbasis mikroba endosimbion pada serangga vektor

Key words, Analisis bioinformatika, Capung, Optimasi PCR, Polymerase Chain Reaction (PCR), *Wolbachia* sp.

Pendahuluan

Wolbachia sp. adalah bakteri gram-negatif yang hidup sebagai endosimbion di dalam sel berbagai spesies artropoda, termasuk serangga dan nematoda filarial (Lorenzo-Carballea *et al.*, 2019). Bakteri ini memiliki distribusi yang luas dan merupakan salah satu mikroba parasit reproduksi yang paling umum ditemukan di biosfer. Diperkirakan *Wolbachia* menginfeksi sekitar dua puluh lima hingga tujuh puluh persen spesies serangga secara global. Penularan *Wolbachia* terjadi secara vertikal melalui telur betina, sehingga bakteri ini dapat diwariskan dari generasi ke generasi. *Wolbachia* mampu memanipulasi mekanisme reproduksi inangnya, misalnya dengan menyebabkan ketidakcocokan sitoplasma, feminisasi, atau kematian embrio jantan. Manipulasi tersebut meningkatkan keberhasilan penyebaran *Wolbachia* dalam populasi inang. Interaksi antara *Wolbachia* dan inangnya bersifat bervariasi, mulai dari parasitisme hingga mutualisme obligat. Pada beberapa spesies, *Wolbachia* bahkan menjadi faktor penting bagi kelangsungan hidup dan reproduksi inang. Selain itu, *Wolbachia* saat ini banyak diteliti dan dimanfaatkan dalam pengendalian vektor penyakit, seperti nyamuk penyebar virus dengue, berkat kemampuannya memodifikasi daya tahan inang terhadap infeksi virus tertentu (Taylor, 2018).

Wolbachia secara alami ditemukan pada sekitar lima puluh persen spesies serangga, termasuk capung, kupu-kupu, dan lebah (Truitt, 2017). Bakteri ini hidup intraseluler dan diturunkan melalui telur serangga betina. Pada capung, infeksi *Wolbachia* telah dilaporkan dengan prevalensi yang bervariasi, bahkan mencapai lebih dari tujuh puluh persen pada

beberapa spesies tertentu. Hubungan antara *Wolbachia* dan capung menunjukkan keragaman efek, mulai dari tanpa dampak yang jelas hingga memengaruhi aspek reproduksi seperti rasio jenis kelamin. Namun, beberapa studi tidak menemukan hubungan signifikan antara infeksi *Wolbachia* dan jenis kelamin capung. Keberadaan *Wolbachia* pada capung juga menunjukkan keragaman strain yang tinggi, yang mengindikasikan dinamika evolusi dan adaptasi kompleks antara bakteri dan inang (Lorenzo–Carballa *et al.*, 2019).

Deteksi *Wolbachia* sp. pada inang serangga umumnya dilakukan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang menargetkan gen spesifik seperti 16S rRNA. Namun, sensitivitas PCR konvensional seringkali terbatas, terutama pada infeksi dengan titer bakteri yang sangat rendah, sehingga berpotensi menghasilkan hasil negatif palsu (false negative) (Schneider *et al.*, 2014). Untuk mengatasi hal ini, beberapa studi mengembangkan metode PCR yang lebih sensitif, seperti digital droplet PCR (ddPCR), yang mampu mendeteksi jumlah salinan gen *Wolbachia* yang sangat sedikit dengan akurasi tinggi (Lee *et al.*, 2024). Selain itu, pendekatan berbasis sekuensing genom secara luas (genome-wide), seperti ddRAD–Seq, juga mulai digunakan untuk mendeteksi *Wolbachia* tanpa bergantung pada primer spesifik, sehingga mengurangi risiko kegagalan deteksi akibat variasi genetik pada target primer (Carvajal *et al.*, 2023). Pendekatan ini memungkinkan identifikasi keberadaan *Wolbachia* pada berbagai populasi inang dengan tingkat keandalan yang lebih tinggi dibandingkan PCR tradisional.

Optimasi primer PCR menjadi langkah krusial dalam meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi *Wolbachia*. Perancangan primer yang tepat harus mempertimbangkan konservasi sekuens target dan menghindari daerah genom yang rentan terhadap mutasi atau variasi strain (Garcia *et al.*, 2021). Penggunaan alat bioinformatika dan analisis *in silico* untuk merancang primer memungkinkan evaluasi parameter penting seperti suhu leleh (T_m), dimers, dan spesifisitas terhadap genom inang maupun bakteri lain (Doudoumis, *et al.*, 2012). Analisis *in silico* juga membantu memastikan bahwa primer dapat mendeteksi berbagai strain *Wolbachia* yang beragam secara genetik, terutama pada populasi alami yang kompleks. Dengan demikian, optimasi primer yang didukung oleh analisis bioinformatika meningkatkan efisiensi PCR dan meminimalkan kesalahan deteksi, sehingga menjadi fondasi penting dalam studi ekologi dan aplikasi biokontrol berbasis *Wolbachia*.

Metode

Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan dilaksanakan pada tanggal 13 Januari - 14 Februari 2025 di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Kota Padang, Sumatera Barat.

Metode Isolasi DNA

Isolasi DNA genom capung dilakukan menggunakan GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) dengan tahapan yang dimulai dari preparasi sampel. Jaringan capung yang telah diawetkan dihaluskan menggunakan pestle dan mortar hingga homogen. Selanjutnya, sekitar 180 μL Digestion Solution ditambahkan untuk melarutkan jaringan, berfungsi memecah dinding dan membran sel sehingga DNA dapat dilepaskan (Mustika, 2022). Penambahan 20 μL Proteinase K dilakukan untuk menghidrolisis protein penyusun sel, terutama protein inti sel, sehingga DNA dapat terlepas secara optimal. Enzim ini bekerja efektif pada suhu 65–70°C, namun inkubasi dilakukan pada suhu 56°C selama tiga jam untuk memastikan lisis jaringan secara menyeluruh (Sophian & Syukur, 2021). Setelah lisis, 20 μL RNase A ditambahkan untuk mengeliminasi kontaminasi RNA, kemudian inkubasi dilanjutkan pada suhu kamar selama sepuluh menit.

Tahap berikutnya adalah penambahan 200 μL Lysis Solution dan pencampuran homogen dengan vortex, diikuti oleh penambahan 400 μL etanol 50% untuk memfasilitasi pengikatan DNA pada membran kolom. Larutan tersebut kemudian dipindahkan ke kolom purifikasi GeneJET yang terpasang pada tabung koleksi, dan disentrifugasi pada kecepatan $6.000 \times g$ selama satu menit. Filtrat dibuang, dan kolom dipindahkan ke tabung koleksi baru berkapasitas 2 mL. Proses pencucian (washing) dilakukan secara bertahap dengan 500 μL Wash Buffer I dan Wash Buffer II yang sudah dicampur etanol, masing-masing disentrifugasi pada kecepatan $8.000 \times g$ selama satu menit dan $\geq 12.000 \times g$ selama tiga menit. Jika terdapat residu larutan, kolom disentrifugasi ulang untuk memastikan kebersihan membran.

DNA genom di-elusi menggunakan 200 μL Elution Buffer yang ditambahkan tepat di tengah membran kolom, diinkubasi selama dua menit pada suhu kamar, kemudian disentrifugasi pada $8.000 \times g$ selama satu menit untuk mengeluarkan DNA murni. Hasil elusi dianalisis konsentrasi dan kemurniannya menggunakan Nanodrop spektrofotometer dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm. DNA yang telah dipurifikasi disimpan pada suhu -20°C untuk menjaga stabilitas dan kualitasnya sebelum digunakan pada analisis selanjutnya.

Metode Analisis Bioinformatika

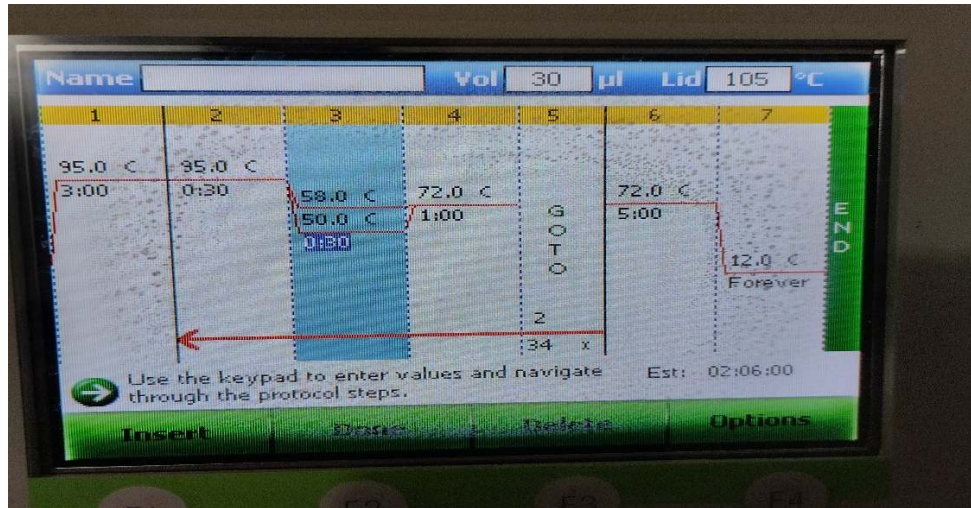
Analisis primer secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan fitur Primer-BLAST yang tersedia pada situs resmi National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Target amplifikasi dalam penelitian ini adalah gen 16S rRNA dari bakteri *Wolbachia* yang diketahui memiliki konservasi tinggi dan berperan penting dalam identifikasi molekuler. Prinsip kerja analisis *in silico* pada dasarnya menyerupai simulasi PCR secara virtual untuk menilai parameter seperti spesifisitas primer, potensi pembentukan struktur sekunder, serta kemungkinan dimerisasi (Putri *et al.*, 2021).

Pasangan primer yang digunakan, yaitu WolbF (5'-GAAGATAATGACGGTACTCAC-3') dan WspecR (5'-AGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3'), dimasukkan ke dalam kolom "Primer Parameters". Untuk memastikan spesifisitas primer terhadap target genetik, pengaturan basis data diubah menjadi "refseq_rna" dan organisme difokuskan pada *Wolbachia* (TaxID: 953). Selain itu, sekuens referensi gen 16S rRNA *Wolbachia* juga dicantumkan pada kolom "Target Specificity Checking" guna membatasi pencocokan primer hanya pada sekuens target. Setelah seluruh parameter ditetapkan, perintah "Get Primers" dijalankan untuk memulai proses evaluasi.

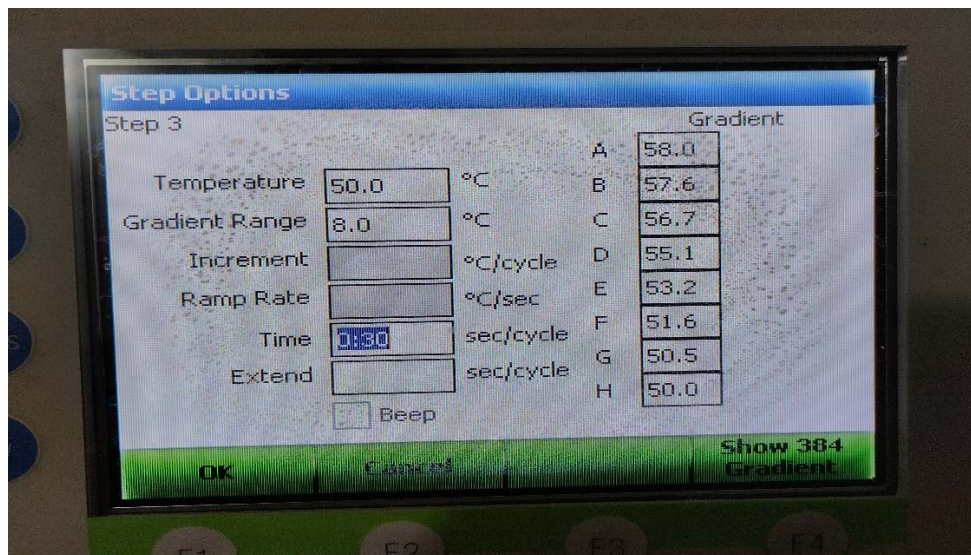
Hasil Primer-BLAST menunjukkan nilai melting temperature (T_m) masing-masing primer, yaitu 53,61 °C untuk WolbF dan 56,82 °C untuk WspecR. Nilai T_m ini menjadi acuan dalam menentukan suhu *annealing* optimal pada reaksi PCR, guna memastikan terjadinya ikatan primer yang efisien dan spesifik terhadap urutan target. Evaluasi ini bertujuan untuk menilai kesesuaian karakteristik biofisik primer terhadap gen target, serta menghindari potensi amplifikasi non-spesifik. Dengan demikian, pendekatan bioinformatika melalui Primer-BLAST menjadi tahap penting dalam mendukung validitas desain primer dan efisiensi optimasi PCR untuk deteksi *Wolbachia* pada sampel capung (*O. sabina*).

Metode Amplifikasi DNA

Prosedur amplifikasi sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan metode PCR gradien untuk mengoptimalkan suhu *annealing* berdasarkan hasil analisis Primer-BLAST sebelumnya. Rentang suhu *annealing* yang digunakan adalah antara 51°C hingga 58°C. Campuran Master Mix PCR disiapkan dengan komposisi 3 µL DNA template hasil isolasi, 2,5 µL 10x PCR buffer yang mengandung Mg²⁺, 2,0 µL dNTP mixture (10 mM/µL), 1,5 µL masing-masing primer *forward* dan *reverse*, 1 µL Taq DNA Polymerase, serta ditambah dengan *double distilled water* hingga volume total tercapai. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR.



Gambar 1. Grafik siklus amplifikasi PCR



Gambar 2. Variasi gradien suhu *annealing* sampel yang diamplifikasi

Setelah proses amplifikasi selesai, produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5%. Produk DNA hasil amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel bersama dengan DNA ladder 1000 bp sebagai penanda ukuran fragmen. Elektroforesis dijalankan dengan pengaturan voltase 100watt selama 1 jam. Setelah selesai, gel diamati menggunakan perangkat GelDoc untuk mendeteksi pita fragmen DNA, yang menunjukkan keberhasilan amplifikasi dan spesifisitas produk PCR.

Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini melibatkan tiga tahapan utama: Pertama, konsentrasi dan kemurnian DNA diukur menggunakan *Nanodrop Spektrofotometer*, dengan analisis data dilakukan oleh perangkat lunak bawaan alat tersebut. Kedua, optimasi primer

untuk mendapatkan *melting temperature* (T_m) dilakukan secara *in silico* menggunakan online tool Primer-BLAST dari NCBI, dengan primer WolbF dan WspecR menghasilkan T_m masing-masing 53,61°C dan 56,82°C. Ketiga, hasil amplifikasi PCR gradien divisualisasikan dan dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa dan perangkat GelDoc. Analisis visual pada gel menunjukkan bahwa suhu *annealing* 55°C dengan konsentrasi primer 0,3 μM memberikan pita DNA tunggal yang paling jelas dan spesifik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA dari sampel capung *Orthetrum sabina* menunjukkan hasil yang memadai untuk keperluan analisis molekuler, dengan konsentrasi DNA berkisar antara 38,1 hingga 61,3 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Nilai konsentrasi ini berada dalam kisaran ideal untuk reaksi PCR, yang biasanya memerlukan template DNA dalam jumlah 10–100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (Sambrook & Russell, 2020). Rasio kemurnian A260/A280 menunjukkan nilai 1,77 hingga 1,90, kecuali pada satu sampel (Mentawai) yang menunjukkan nilai ekstrem sebesar 5,03. Nilai ini kemungkinan disebabkan oleh kesalahan teknis saat pengukuran atau adanya kontaminasi dengan senyawa absorban lain. Secara umum, rasio A260/A280 yang optimal untuk DNA murni dan bebas kontaminan protein adalah antara 1,7 hingga 2,0 (Wilfinger *et al.*, 2020). Oleh karena itu, dua dari tiga sampel yaitu sampel TP Mentawai dan sampel Karimun telah memenuhi syarat kualitas untuk amplifikasi lebih lanjut.

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian DNA genom dari sampel capung (*O. sabina*)

No.	Sample	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	Sample Type
1	TP Mentawai	61,3	$\text{ng}/\mu\text{l}$	1,77	DNA
2	Karimun	38,1	$\text{ng}/\mu\text{l}$	1,9	DNA
3	Mentawai	4,8	$\text{ng}/\mu\text{l}$	5,03	DNA

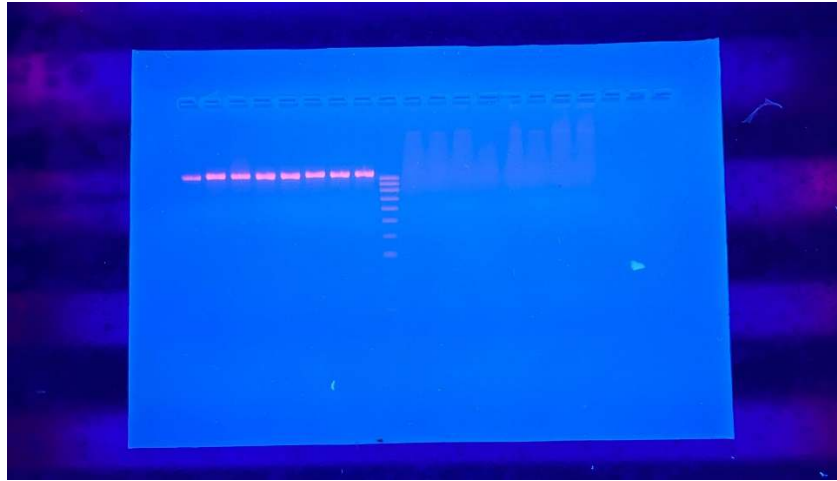
Keberhasilan isolasi ini tidak terlepas dari protokol yang digunakan, yaitu metode berbasis kolom GeneJET yang memanfaatkan Proteinase K untuk lisis jaringan dan RNase A untuk menghilangkan RNA. Metode ini terbukti efektif dalam mengekstraksi DNA dari jaringan invertebrata kecil seperti capung, bahkan pada sampel yang telah diawetkan

(Matsumoto *et al.*, 2019). Kelebihan pendekatan ini adalah kemampuannya menghasilkan DNA berkualitas tinggi secara cepat dan tanpa penggunaan bahan kimia berbahaya seperti fenol–kloroform. Oleh karena itu, hasil isolasi yang diperoleh tidak hanya layak untuk PCR, tetapi juga memberikan dasar kuat bagi keberhasilan deteksi *Wolbachia* sp. pada tahap molekuler selanjutnya (Giang *et al.*, 2021).

Optimalisasi primer merupakan tahapan penting untuk memastikan efisiensi dan spesifisitas amplifikasi DNA target. Primer yang telah dirancang akan diperiksa spesifisitasnya menggunakan alat PrimerBLAST di situs NCBI untuk memastikan bahwa primer yang telah dirancang benar–benar spesifik (Achyar *et al.*, 2021). Primer WolbF dan WspecR yang digunakan pada penelitian ini dianalisis terlebih dahulu secara *in silico* menggunakan Primer–BLAST untuk menyesuaikan suhu *annealing* berdasarkan nilai melting temperature (T_m). Menurut pedoman desain primer PCR, primer harus memenuhi kriteria ideal dengan panjang nukleotida berkisar antara 18–30 mer, komposisi GC sebesar 50%, selisih T_m antara primer maju dan mundur tidak lebih dari 2–3°C, dan tidak membentuk struktur sekunder (hairpin atau self–dimer) (Achyar *et al.*, 2021). Primer dengan panjang lebih dari 30 basa tidak direkomendasikan, karena tidak menunjukkan spesifisitas yang lebih tinggi (Yuselman *et al.*, 2023).

Persentase GC merupakan faktor penting dalam merancang primer PCR. Persentase GC adalah jumlah basa guanin dan sitosin dalam primer yang berhubungan dengan suhu pelelehan. Selain itu, persentase GC juga berhubungan dengan ikatan antara untai DNA. Untuk memecah ikatan hidrogen GC, diperlukan energi dan suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan AT. Kandungan GC yang tinggi akan menyulitkan pemecahan rantai ganda dalam primer dan cetakan. Selain itu, kandungan GC yang rendah pada primer menyebabkan primer tidak dapat menempel dan akan berdampak pada penurunan efisiensi PCR. Idealnya, persentase kandungan GC berada dalam rentang 40–60%.

Hasil analisis menunjukkan T_m masing–masing primer sebesar 53,61°C untuk WolbF dan 56,82°C untuk WspecR. Pasangan primer yang disintesis dioptimalkan menggunakan PCR gradien untuk mendapatkan suhu *annealing* yang tepat. Suhu gradien diatur sesuai dengan suhu pelelehan (T_m) masing–masing primer (Atifah & Acgyar, 2022). Berdasarkan hasil ini, PCR dilakukan dengan metode gradien suhu *annealing* dalam rentang 50°C hingga 58°C serta variasi konsentrasi primer antara 0,2–0,4 μ M. Tujuannya adalah untuk memperoleh kondisi yang menghasilkan pita DNA tunggal yang paling jelas dan spesifik tanpa adanya pita nonspesifik atau dimer primer (Garcia *et al.*, 2021).



Gambar 3. Pita sampel hasil amplifikasi PCR Gradien

Hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% menunjukkan bahwa suhu *annealing* 55°C dengan konsentrasi primer 0,3 µM memberikan hasil terbaik. Pada kondisi ini diperoleh pita DNA tunggal dengan intensitas kuat, menandakan keberhasilan amplifikasi fragmen gen 16S rRNA dari *Wolbachia* sp. (**Gambar 3**). Tidak ditemukan pita ganda atau *smear* yang mengindikasikan amplifikasi non-spesifik. Hasil ini sejalan dengan prinsip dasar PCR gradien yang bertujuan mengidentifikasi suhu *annealing* paling optimal secara empiris untuk reaksi primer-target spesifik (Dewi *et al.*, 2019). Keberhasilan optimasi ini memberikan dasar yang kuat bagi studi lanjutan mengenai deteksi *Wolbachia* pada inang serangga, serta mendukung pengembangan teknik biokontrol berbasis mikroba endosimbion.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengoptimasi pasangan primer WolbF dan WspecR untuk deteksi bakteri *Wolbachia* sp. pada sampel capung *O. sabina* menggunakan metode PCR. Proses optimasi meliputi penyesuaian suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang divalidasi melalui elektroforesis dan analisis *in silico* menggunakan Primer-BLAST. Hasil menunjukkan bahwa suhu *annealing* 55°C dan konsentrasi primer 0,3 µM merupakan kondisi optimal yang menghasilkan pita DNA tunggal, jelas, dan spesifik tanpa adanya amplifikasi non-spesifik. Keberhasilan ini menunjukkan bahwa protokol PCR yang telah dioptimalkan mampu mendeteksi keberadaan *Wolbachia* secara sensitif dan spesifik pada jaringan capung. Temuan ini memberikan kontribusi penting dalam pengembangan metode molekuler untuk studi ekologi mikroba endosimbion, serta membuka peluang penerapan strategi biokontrol berbasis *Wolbachia* pada serangga vektor.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kegiatan yang telah dilaksanakan penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Biomedik (Riset Terpadu) Pusat Diagnostik dan Riset Non-Infeksi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas atas fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama pelaksanaan magang dan penelitian.

Selain itu penulis juga berterima kasih kepada dr. Hirowati Ali, Ph.D. selaku pembimbing di Laboratorium Biomedik, atas bimbingan dan dukungan yang tak ternilai. Tak lupa, terima kasih kepada seluruh teknisi laboratorium yang telah banyak membantu dalam proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Achyar, A., Atifah, Y., & Putri, D. H. (2021, June). In silico study of developing a method for detecting pathogenic bacteria in refillable drinking water samples. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1940, No. 1, p. 012061). IOP Publishing.
- Achyar, A., Putri, A. I., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, in silico PCR and optimum annealing temperature for *Escherichia coli* detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52–60.
- Atifah, Y., & Achyar, A. (2022). Design of specific primer for methallothionein gene of tor fish (*Tor tambra*). *Natural Science Journal Of Science and Technology*, 11(2), 42–48.
- Carvajal, M. A., Smith, J. D., & Ramirez, L. F. (2023). Genome-wide approaches for detecting *Wolbachia* infections in insect populations. *Molecular Ecology Resources*, 23(4), 1125–1136.
- Dewi, R. S., Fadilah, R., & Nurfadilah, M. (2019). Desain primer PCR spesifik secara *in silico* untuk amplifikasi gen target. *Jurnal Kauniah, Universitas Islam Negeri Jakarta*.
- Garcia, P. R., Nguyen, T. H., & Lee, S. Y. (2021). Primer design optimization for sensitive detection of *Wolbachia* in mosquito vectors. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 567–578.
- Giang, H. T., Minh, H. V., & Truong, Q. D. (2021). Evaluation of DNA quality and quantity using spectrophotometry for molecular applications. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 19(2), 301–308. <https://doi.org/10.15625/2615-9023/15333>
- Lee, H. J., Kim, S. Y., & Park, J. W. (2024). Digital droplet PCR for accurate quantification of *Wolbachia* in low-titer insect samples. *Journal of Microbiological Methods*, 198, 106541. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106541>
- Lorenzo-Carballa, M. O., Torres-Cambas, Y., Heaton, K., Dincă, V., Outomuro, D., & Cordero-Rivera, A. (2019). Widespread *Wolbachia* infection in an insular radiation of

- damsel flies (Odonata, Coenagrionidae). *Scientific Reports*, 9, 11933. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-1>
- Matsumoto, R., Kataoka, M., & Miyamoto, H. (2019). Efficient DNA extraction from preserved insect samples using silica-based columns. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 211–221. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12947>
- Mustika, M. (2022). Protokol isolasi DNA genom capung menggunakan GeneJET Genomic DNA Purification Kit. *Jurnal Bioteknologi Terapan*, 5(1), 15–22.
- Doudoumis, V., Tsiamis, G., Wamwiri, F., Brelsfoard, C., Alam, U., Aksoy, E., Dalaperas, S., Abd-Alla, A., Ouma, J., Takac, P., Aksoy, S., & Bourtzis, K. (2012). Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). *BMC microbiology*, 12 Suppl 1(Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S3>
- Putri, A. I., Achyar, A., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, *in silico* PCR and optimum *annealing* temperature for *Escherichia coli* detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52–60.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2020). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, D., Fischer, K., & Müller, C. (2014). Limitations of conventional PCR in detecting *Wolbachia* infections in insect hosts. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.019>
- 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). *Jurnal Ilmu Peternakan, Universitas Gadjah Mada*.
- Sophian, A., & Syukur, M. (2021). Efektivitas Proteinase K dalam proses lisis protein pada isolasi DNA genomik. *Jurnal Bioteknologi Indonesia*, 18(1), 23–30. <https://doi.org/10.1234/jbiotek.2021.01801>
- Taylor, M. J., Bordenstein, S. R., & Slatko, B. (2018). Microbe profile: *Wolbachia*: A sex selector, a viral protector and a target to treat filarial nematodes. *Microbiology (Reading, England)*, 164(11), 1345–1347. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000724>
- Truitt, A. M. (2017). *Wolbachia*-host interactions and the implications to insect conservation and management (Doctoral dissertation, Portland State University). *Dissertations and Theses, Paper 3643*. <https://doi.org/10.15760/etd.5527>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Krug, D. E. (2020). Practical evaluation of nucleic acid purity and integrity using spectrophotometric ratios. *BioTechniques*, 69(3), 171–179. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0039>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2021). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yuselman, O., Putri, D. H., Ahda, Y., & Achyar, A. (2023, May). Primers Design and PCR Optimization for Developing *Salmonella* Sp. Detection Method on Refillable Drinking

Water Sample. In 3rd International Conference on Biology, Science and Education (IcoBioSE 2021) (pp. 521–530). Atlantis Press.