

Desain Primer Spesifik Vektor Dengue *Aedes aegypti* Berdasarkan DNA Pengkode ITS-1, 5.8S Ribosomal RNA, dan ITS-2

(SPECIFIC PRIMER DESIGN OF DENGUE VECTOR *Aedes aegypti*
BASED ON THE CODING DNA ITS-1, 5.8S RIBOSOMAL RNA, AND ITS-2)

Kurnia Ayu Miranti¹, Sri Wahyuni¹, Tutut Indra Permana¹,
Diani Fatmawati², dan Moh Mirza Nuryady^{1*}

¹Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan,
Universitas Muhammadiyah Malang,
Jl. Raya Tlogomas 246 Malang Jawa Timur 65144, Indonesia

²Graduate School of Biotechnology,
College of Life Sciences,
Kyung Hee University, Seoul, Republic of South Korea

*Email: mirzanuryady@umm.ac.id

ABSTRACT

Identification of dengue hemorrhagic fever (DHF) vector species is important for vector control programs. Internal Transcribed Spacer (ITS) of DNA markers is one of the DNA markers that is generally used to identify a species. This study was aimed to obtain potential primers with specific results for *Aedes aegypti* mosquito species based on DNA sequences ITS-1, 5.8S Ribosomal RNA and ITS-2. This research was an *in silico* descriptive study using Primer3 and Primer-BLAST, as well as an *in vitro* confirmation stage was used the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The sequence of DNA data was obtained from NCBI with accession numbers GU980956.1 and ON652374.1. The results of *in silico* primer design obtained two pairs of potential primers, namely primer 1) Left 5'-CATTGCTAGTCCCTCGGG-3' Right 5'-CACCACACCACGTCTGAC-3', and primer 2) Left 5'-CATTGCTAGTCCCTCGGG-3' Right 5'-CATCAACCGCGG TGTGTC- 3'. Visualization of PCR results was detected using a 1.5% agarose gel with a product size of around 800 bp. The conclusion of this study was that two pairs of ITS primers were obtained which had the potential to identify *A. aegypti* mosquitoes.

Keywords: *Aedes aegypti*; primer design; ITS; PCR

ABSTRAK

Identifikasi spesies vektor demam berdarah dengue (DBD) penting dilakukan untuk program pengontrolan vektor. Penanda DNA *Internal Transcribed Spacer* (ITS) adalah salah satu penanda DNA yang umumnya digunakan untuk mengidentifikasi satu spesies. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer yang potensial dengan hasil spesifik terhadap spesies nyamuk *Aedes aegypti* berdasarkan sekuen DNA ITS-1, 5.8S ribosomal RNA dan ITS-2. Penelitian ini adalah penelitian deskriptif secara *in silico* menggunakan Primer3 dan Primer-BLAST serta tahap konfirmasi secara *in vitro* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Data sekuen DNA diperoleh dari NCBI dengan nomor akses GU980956.1 dan ON652374.1. Hasil desain primer secara *in silico* diperoleh sebanyak dua pasang primer potensial yaitu primer 1) Left 5'-CATTGCTAGTCCCTCGGG-3' Right 5'-CACCACACCACGTCTGAC-3', dan primer 2) Left 5'-CATTGCTAGTCCCTCGGG-3' Right 5'-CATCAACCGCGGTGTGTC-3'. Visualisasi hasil PCR dideteksi menggunakan gel agarosa 1,5% dengan ukuran produk sekitar 800 bp. Simpulan penelitian ini adalah diperoleh dua pasang primer ITS yang potensial untuk mengidentifikasi nyamuk *A. aegypti*.

Kata-kata kunci: *Aedes aegypti*; desain primer; ITS; PCR

PENDAHULUAN

Virus dengue merupakan virus yang dapat menyebabkan terjadinya infeksi Demam Berdarah Dengue (DBD). Empat serotipe virus dengue yang berbeda adalah DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4, yang semuanya merupakan anggota famili Flaviridae dan genus *Flavivirus* (Aryati dan Wardhani, 2010). Virus dengue dapat menular melalui vektor nyamuk *Aedes aegypti* (Chandra, 2019). Sekitar 2,5 miliar orang dari populasi penduduk yang ada di dunia terjangkit DBD. Di Kota Malang telah terjadi 360 kasus DBD pada bulan Januari hingga Juni 2022 (Ratri *et al.*, 2017). Penanganan DBD di Kota Malang khususnya, masih belum memberikan hasil yang maksimal (Lang *et al.*, 2021). Hal ini mungkin karena kurangnya efisiensi pengendalian vektor. Populasi vektor *A. aegypti* yang berasal dari daerah berbeda memiliki kerentanan terhadap virus dengue yang berbeda pula (Siagian *et al.*, 2017). Diperkirakan adanya perbedaan genetik pada vektor DBD dapat memengaruhi keberhasilan pengendalian nyamuk (Aseptianova *et al.*, 2017).

Screening spesies untuk efektivitas insektisida merupakan salah satu pengendalian nyamuk menggunakan pendekatan biologi molekuler. Teknik analisis identifikasi spesies dapat dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Astari *et al.*, 2021). Proses PCR membutuhkan penanda spesifik, salah satunya yakni penanda *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Senyawa DNA penanda ITS ini umumnya digunakan untuk mengetahui keragaman genetik pada makhluk hidup eukariotik (Mulyatni *et al.*, 2011; Yen *et al.*, 2013). Daerah DNA pengkode ITS dibagi menjadi ITS-1 yang berada di ribosom sub unit kecil dan 5.8S rRNA, dan ITS-2 yang berada di ribosom sub unit besar dan 5.8S rRNA (Norris dan Norris, 2015). *Region* ITS memiliki ciri yang unggul yakni panjang kurang lebih 700 pasang basa dan memiliki genom inti dengan salinan yang banyak (Hariri, 2021). Muhsinin *et al* (2019) dengan penelitiannya menggunakan penanda ITS-1 dan ITS-2 menunjukkan bahwa nyamuk *A. aegypti* memiliki keragaman genetik yang cukup tinggi. Menurut Senjarini *et al* (2021) bahwa penanda DNA yang banyak digunakan untuk identifikasi nyamuk yakni ITS-1, 5.8S Ribosomal RNA, dan ITS-2. Penanda ini memiliki kemampuan untuk membedakan spesies yang berkerabat dekat dan

termasuk sekuen memadai (Rambe *et al.*, 2014).

Penelitian ini berfokus pada eksplorasi kandidat primer spesifik untuk *A.aegypti* berdasarkan DNA pengkode ITS-1, 5.8S ribosomal RNA dan ITS-2. Sekuen DNA ITS di Indonesia memiliki panjang nukleotida kurang dari 400 bp Wijirahayu dan Sukesni (2019), sehingga dibutuhkan primer spesifik dengan sekuen yang lebih panjang. Lebih lanjut lagi, masih sedikit informasi terkait penelitian sejenis yang membahas desain primer DNA ITS terhadap *A. aegypti* di Indonesia. Desain primer dapat dilakukan dengan cara *in silico* dan dikonfirmasi secara *in vitro* menggunakan PCR (Messe *et al.*, 2020). Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya tentang eksplorasi keragaman genetik berdasarkan DNA penanda ITS untuk spesies *A. aegypti* di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional dengan pendekatan secara kualitatif. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia, Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu penelitian dilaksanakan dari bulan Juli hingga Oktober 2022. Sampel yang digunakan adalah DNA nyamuk dewasa *A. aegypti* yang berumur 3-5 hari dari Kota Malang. Metode yang dilakukan pada penelitian ini yakni secara *in silico* dan *in vitro* menggunakan teknik PCR.

Persetujuan Etik

Penelitian ini telah memperoleh pembebasan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang pada surat keterangan layak etik nomor E.5.a/262/KEPK-UMM/XII/2021.

Penentuan *Template* DNA

Template DNA sebagai acuan untuk desain primer yakni sekuen ITS-1, 5.8S ribosomal RNA dan ITS-2 diperoleh dari *database* NCBI. Urutan yang digunakan dalam penelitian ini masing-masing memiliki nomor aksesori ON652374.1 Indonesia 337 bp yang di *alignments* dengan GU980956.1 Saudi Arabia 949 bp. Lebih lanjut dalam proses desain primer *in silico*, urutan yang diperoleh disimpan dalam format FASTA.

Desain Primer

Kandidat pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini yakni untuk mengamplifikasi didesain melalui Primer-BLAST dengan menggunakan parameter tertentu (Tabel 1). Dua pasangan primer diperoleh dengan mengunggah urutan DNA dalam format FASTA yang berisi sekuen ITS-1, 5.8S ribosomal RNA dan ITS-2 ke Primer-BLAST.

Identifikasi Morfologi *A. aegypti*

Identifikasi nyamuk dilakukan untuk memastikan secara morfologi adalah spesies *A. aegypti*. Identifikasi morfologi ini menggunakan mikroskop digital 3.6 MP. Pengamatan lebih lanjut dilakukan dengan melihat ciri khusus morfologi pada nyamuk *A.s aegypti* yang terdiri atas *caput, thorax, abdomen, ventral brush, tuft, dan comb*.

Isolasi DNA

Metode untuk mengisolasi DNA nyamuk *A. aegypti* adalah metode *Salt-out Extraction*. Sampel sebanyak lima nyamuk dituangkan pada mikropistil dan diekstraksi dengan menambahkan 100 µL larutan *homogenizing buffer* kemudian menambahkan ulang hingga 400 µL. Sampel tersebut dimasukkan dalam *tube* untuk ditambahkan sebanyak 40 µL SDS konsentrasi 20% dan 8 uL proteinase-K. Inkubasi *overnight*, dilakukan dengan suhu 65°C, kemudian ditambahkan dengan 300 µL NaCl 6M, dan dilakukan sentrifugasi. Supernatan diambil dengan ditambahkan *isopropanol equal volume* dalam kondisi dingin serta inkubasi pada suhu -20°C, dan supernatan dibuang. *Pellet* yang mengandung DNA tersebut dicuci dengan 300 µL ethanol 70%. Sentrifugasi dengan suhu 4°C dan *pellet* DNA dikeringkan untuk dapat dilanjutkan untuk tahap PCR.

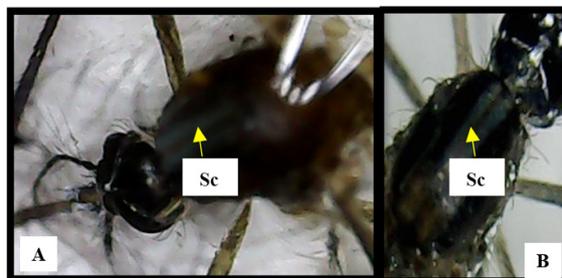
Polymerase ChainReaction (PCR)

Amplifikasi DNA *A. aegypti* menggunakan dua pasangan primer ITS-1, 5.8S ribosomal RNA, dan ITS-2. Amplifikasi PCR dalam larutan DNA hasil isolasi sehingga didapatkan konsentrasi 10 µL dengan larutan PCR yang terdiri 3 µL *template* DNA (10 µL), 12,5 µL PCR mix, 4 µL masing-masing primer, dan 3 µL dH₂O. Setting PCR dengan temperatur yang digunakan pre-denaturasi 95°C, denaturasi 95°C, *annealing* 50°C, elongasi 72°C, dan post-elongasi 72°C dilakukan sebanyak 30 siklus. Produk PCR sebanyak 10 µL *running* pada 1,5%

gel agarose yang telah ditambahkan *Etidium Bromide* (EtBr). Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 50 volt selama 50 menit. Elektroforesis dapat dilihat dengan menggunakan *instrument gal documentation* di bawah sinar UV. Hasil elektroforesis terlihat pada layar PC berupa pita atau *band* DNA.

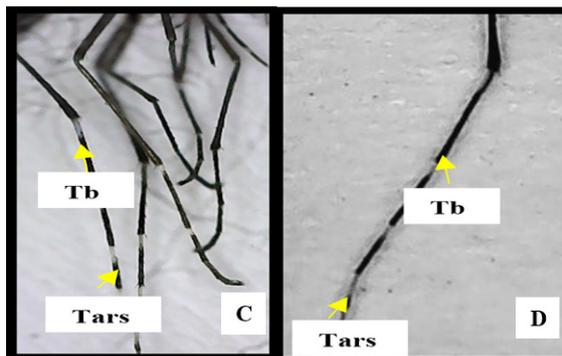
HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi nyamuk dilakukan untuk memastikan secara morfologi adalah spesies *A. aegypti*. Nyamuk *A. aegypti* diidentifikasi secara morfologi dengan mikroskop digital 3.6 MP. Hasil identifikasi nyamuk yang diujikan memiliki morfologi yang sesuai dengan *A. aegypti*. Morfologi dari nyamuk *A. aegypti* pada bagian tubuh dan tungkainya terlihat sisik dengan warna garis-garis putih keperakan.



Gambar 1. Identifikasi morfologi bagian dorsal
A: Dokumen pribadi, 2022 dan
B: Mu'azah *et al.* (2021)

Keterangan: Sc = *scutum* terdapat pada bagian dorsal berwarna putih transparan diantara dua garis lengkung



Gambar 2. Identifikasi morfologi bagian tungkai
C: Dokumen pribadi, 2022 dan
D: Mu'azah *et al.*, (2021)

Keterangan: Tb= *tibia*; Tars= *tarsus* ditandai dengan berbentuk pita atau garis putih keperakan dengan dasar hitam

Tabel 1. Parameter yang digunakan pada Primer-BLAST

Parameter	Pengaturan
<i>Product size</i>	<i>Min:</i> 746 <i>Max:</i> 949
<i>Primer melting temperatures (T_m)</i>	<i>Min:</i> 55.0 <i>Max:</i> 60.0
<i>Primer GC%</i>	<i>Min:</i> 56.0 <i>Max:</i> 80.0

Tabel 2. Data sekuen DNA ITS spesies *Aedes aegypti*

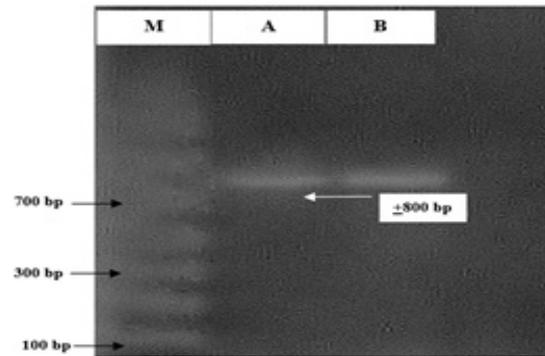
No	Nomor genbank	Panjang basa nukleotida
1	GU980956.1 Saudi Arabia	949 bp
2	M95126.1 USA	948 bp
3	ON652374.1 Indonesia	337 bp
4	KU056489 Kenya	746 bp
5	AY512666.1 Indonesia	295 bp

Ciri khusus pada *A. aegypti* terlihat dari *scutum* yang terdapat pada bagian *dorsal* (Gambar 1) (Setyaningsih dan Alfiah, 2014). *Scutum A. aegypti* memiliki warna putih di antara dua garis lengkung (Qibtiyah *et al.*, 2022; Pombo *et al.*, 2021). Bagian kaki *A. aegypti* (Gambar 2) terlihat berbentuk pita dengan garis putih keperakan serta dasar hitam (Berri *et al.*, 2020).

Studi *in silico* desain primer menggunakan *website* Primer-BLAST. Penelitian ini secara spesifik menggunakan sekuen DNA ITS-1, 5.8S ribosomal RNA, dan ITS-2. Data hasil penelusuran sekuen DNA diperoleh sebanyak lima kandidat (Tabel 2). Data yang diperoleh dari spesies *A. aegypti*

Tabel 3. Data desain primer ITS-1, 5.8S Ribosomal RNA, dan ITS-2

No	Pasang primer	T _m	%GC	<i>Product size</i>
Primer 1	LEFT CATTGCTAGTCCCTCGGG	57,61	57,89	806
	RIGHT CACCACACCACGTCTGAC	57,97	61,11	
Primer 2	LEFT CATTGCTAGTCCCTCGGG	57,61	57,89	823
	RIGHT CATCAACCGCGGTGTGTC	59,14	61,11	



Gambar 3. Hasil Elektroforesis PCR
Keterangan: M = Marka 1 kb, A dan B = Amplikon ITS-1, 5.8S Ribosomal RNA, dan ITS-2 pada suhu *annealing* 50°C

dengan panjang basa nukleotida yang beragam ditunjukkan pada Tabel 2. Data tersebut hanya diambil dua data dengan panjang *base pair* tertinggi dengan daerah sekuen ITS-1, 5.8S ribosomal RNA, dan ITS-2, sehingga diperoleh pada nomor GU980956.1 Saudi Arabia sebesar 949 bp dan ON652374.1 Indonesia sebesar 337 bp. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Saraswati *et al.* (2019) bahwa semakin panjang ukuran *base pair* yang digunakan maka semakin spesifik daerah yang teramplifikasi.

Peneliti berfokus pada sekuen *its* a. *aegypti* di Indonesia, namun sekuen DNA Indonesia <400 bp sehingga perlu dilakukan penyuntingan dengan aplikasi MEGA versi 11. Sekuen DNA dianalisis menggunakan Primer3 yang diperoleh sebanyak dua pasang primer (Tabel 3). Penelitian yang dilakukan oleh Nuryady *et al.* (2020) menyatakan bahwa desain primer dapat dilakukan dengan menggunakan Primer3. Hasil desain primer kemudian dianalisis secara deskriptif menggunakan Primer-BLAST. Menurut (Muhsinin *et al.* (2019) bahwa Primer-BLAST dapat untuk memastikan bahwa suatu spesies spesifik.

Kedua kandidat primer yang diperoleh digunakan sebagai hasil desain primer yang sesuai dan memenuhi standar kelayakan primer dengan memperhatikan panjang basa nukleotida dan parameter lain seperti nilai Tm dan %GC yang dapat memberikan pengaruh pada primer. Kandidat primer yang diperoleh telah memenuhi kriteria kelayakan primer berdasarkan panjang basa pada primer yakni 19-20 bp. Hal ini sejalan dengan penelitian Abdullah *et al.* (2019) bahwa primer umumnya memiliki panjang basa 15-25 bp dengan tidak memiliki selisih yang tinggi dengan suhu leleh. Primer *Melting Temperature* (Tm) sebagai suhu yang digunakan ketika primer dupleks mengalami lepas ikatan dan nilai %GC merupakan jumlah basa G dan C yang ada dalam primer. Menurut Yustinadewi *et al.* (2018) bahwa nilai %GC disarankan dengan rentang 50-60%, namun hasil penelitian menunjukkan nilai %GC antara 57-61%. Nilai %GC dapat memberikan pengaruh pada ikatan antar untai DNA. Hasil nilai %GC yang tinggi dapat mengakibatkan ikatan antar untai DNA menjadi kuat karena GC memiliki lebih banyak ikatan antar nukleotida daripada AT sehingga berpengaruh pada nilai Tm (Maitriani *et al.*, 2015; Alfritri *et al.*, 2022)). Kedua kandidat primer menunjukkan bahwa nilai Tm telah memenuhi standar kriteria primer yang baik. Primer dengan nilai Tm pada kisaran antara 52-60°C ideal, namun jika nilai Tm melebihi 65°C dapat mengurangi efektivitas *annealing* dan menyebabkan proses amplifikasi DNA kurang berjalan baik (Yustinadewi *et al.*, 2018).

Kedua pasang primer memiliki nilai Tm yang termasuk ideal yakni antara 57-59°C. Proses amplifikasi PCR secara umum dilakukan dengan tahapan denaturasi, *annealing*, dan elongasi (Aminah *et al.*, 2019). Pada penelitian ini suhu yang diujikan yakni suhu *annealing* yakni sebesar 48°C, 50°C, dan 52°C. Suhu yang menunjukkan pita DNA yang jelas terdapat pada suhu 50°C. Suhu yang digunakan harus optimal karena jika suhu terlalu panas/tinggi dapat menyebabkan kegagalan amplifikasi DNA akibat tidak terjadi penempelan primer. Menurut Hermansyah *et al.* (2018) bahwa suhu *annealing* yang digunakan merupakan suhu dengan selisih sebesar 5°C di bawah *temperature melting* (Tm) yang dimiliki primer, sehingga suhu *annealing* yang digunakan sebesar 50°C. Hasil dari konfirmasi desain primer secara *in vitro* (PCR) didapatkan pita DNA. Pita DNA yang dikonfirmasi melalui *gal documentation* dengan kedua primer berhasil mengamplifikasi DNA *A. aegypti* berukuran sekitar 800 bp dibandingkan dengan *marker* Qiagen 1 kb (Gambar 3).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa dengan mendesain primer secara *in silico* menggunakan primer3 dapat diperoleh primer yang potensial dan memenuhi kriteria primer yang spesifik terhadap spesies. Dua pasang primer potensial yakni Left (5'-CATTGCTAGTCCCTCGGG-3') Right (5'-CACACACACCGTCTGAC-3') dan Left (5'-CATTGCTAGTCCCTCGGG-3') Right (5'-CATCAACCGCGGTGTGTC-3'). Dua pasang primer tersebut menghasilkan amplicon ukuran sekitar 800 bp pada suhu *annealing* yang digunakan yakni 50°C.

SARAN

Penggunaan bahan *isopropanol equal volume* harus dalam keadaan dingin agar dapat menurunkan aktivitas molekul air sehingga memudahkan dalam presipitasi DNA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DPPM UMM dengan skema P2I yang telah membiayai penelitian ini serta semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah A, Sativa HA, Nurhayati T, Nurilmala M. 2019. Pemanfaatan DNA Barcoding untuk Ketulusuran Label Berbagai Produk Olahan Ikan Berbasis Surimi Komersial. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 22(3): 508–519.
- Alfritri M, Abdullah A, Nugraha R. 2022. Identifikasi Spesies Ikan Hiu dan Pari pada Produk Olahan Ikan Asap dengan Metode DNA Barcoding. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 25(1): 163–171.
- Aminah A, Ramadini R, Naid T. 2019. Analisis Cemarkan DNA Tikus pada Bakso Daging Sapi yang Beredar di Makassar dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Galenika* 5(1): 93–100.
- Aryati, Wardhani P. 2010. Clinical Pathology and Medical Laboratory. *Jurnal Indonesia* 17(1): 21–24.

- Aseptianova A, Wijayanti FT, Nurina N. 2017. Efektifitas Pemanfaatan Tanaman Sebagai Insektisida Elektrik Untuk Mengendalikan Nyamuk Penular it Dbd. *Bioeksperimen* 3(2): 10-19.
- Astari D, Gustiani DS, Setyaningrum, S, Lidya B. 2021. Perancangan Primer untuk Deteksi Kandungan Gen Cytochrome b Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction dan Aplikasinya pada Berbagai Produk Industri. *Journal of Chemistry* 6(2): 110–117.
- Berri DWS, Almet J, Wuri DA. 2020. Aktivitas Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Sebagai Larvasida Terhadap i Di Kecamatan Kelapa Lima Kota Kupang. *Jurnal Kajian Veteriner* 8(1): 54–68.
- ariri MR, Peniwidiyanti P, Irsyam ASD, Irwanto RR, Martiansyah I, Kusnadi K, Yuhaeni E. 2021. Molecular Identification and Morphological Characterization of *Ficus* sp. (Moraceae) in Bogor Botanic Gardens. *Jurnal Biodjati* 6(1): 36–44.
- Chandra E. 2019. Pengaruh Faktor Iklim, Kepadatan Penduduk dan Angka Bebas Jentik (ABJ) Terhadap Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kota Jambi. *Jurnal Pembangunan Berkelanjutan* 1(1): 1–15.
- Hermansyah H, Sutami N, Miksusanti M. 2018. Amplifikasi PCR Domain D1/D2 28S rDNA Menggunakan Primer ITS1 dan ITS4 Sampel DNA Dari Candida tropicalis yang Diisolasi dengan Metode Pendinginan. *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry* 1(1): 1-9.
- Lang F, Syamsul M, Hamdani Nur N. 2021. Penerapan 3M Terhadap Pencegahan Kejadian DBD Di Wilayah Puskesmas Panambungan Kota Makassar. *Journal of Health Quality Development* 1(1): 38–43.
- Maitriani LKB, Wirajana IN, Yowani SC. 2015. Desain Primer untuk Amplifikasi Fragmen Gen inhA Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Caktra Kimia* 3(3): 89–95.
- Messe Y, Budiarsa IM, Hakim LA. 2020. Desain Primer Polymerase Chain Reaction (PCR) secara In Silico untuk Amplifikasi Gen gyrA Extensively Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB). *Journal of Biology Science and Education* 8(2): 616–622.
- Mu'azah ZA, Rofieq A, Nuryady MM, Permana TI, Dinindra AM, Agustin JU, Sasmitasari NID, Setiawan MAL, Irrodah PA. 2021. Uji Susceptibility Nyamuk Aedes aegypti terhadap Insektisida Malathion di Wilayah Fogging Kabupaten Malang. *Bioscientist* 9(2): 378–388.
- Muhsinin S, Sulastris MM, Supriadi D. 2019. Deteksi Cepat Gen InvA pada *Salmonella* spp. dengan Metode PCR. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis* 5(3): 191-200.
- Mulyatni, A.S, Priyatmojo A, Purwantara A. 2011. Sekuen Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan jamur sekerabat pembeding. *Menara Perkebunan* 79(1): 1–5.
- Norris LC, Norris DE. 2015. Phylogeny of anopheline (Diptera: Culicidae) species in southern Africa, based on nuclear and mitochondrial genes. *Journal of Vector Ecology* 40(1): 16–27.
- Nuryady M, Husamah H, Miharja FJ, 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* 4(2): 223–233.
- Putri DF, Triwahyuni T. 2019. Deteksi Virus Dengue Secotipe-3 dan Peran Spermateka dalam Penularan Secara Transvenereal pada Nyamuk *Aedes aegypti* Betina. *Mandala of Health* 12(1): 130-139.
- Qibtiyah SM, Nuryady MM, Susetyarini RE, Permana TI, Sasongkojati A. 2022. Analisis Status Resistensi Aedes aegypti terhadap Insektisida Cypermethrin 0,05% Di Kecamatan Endeemis Kabupaten Malang. *Jurnal Ilmiah Biologi* 10(1): 240–251.
- Rambe E, Restuhadi F, Nugroho TT. 2014. Amplifikasi DNA dan Sekuensing Daerah ITS-1 rDNA Trichoderma sp. LBKURCC22. *Jurnal Indonesian Chemia Acta* 4(2): 41–47.
- Ratri AR, Wahyuningsih NE, Murwani R, Pertanian F. (2017). Hubungan Kepadatan Hunian Dengan Kejadian Demam Berdarah Dengue. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* 5(5): 434–440.
- Saraswati H, Wahyuni DF. 2019. Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity* 3(1): 33–38.

- Senjarini K, Hasanah LNU, Septianasari MA, Abdullah MK, Oktarianti, R, Wathon S. 2021. Karakterisasi Berbasis Marka Molekuler ITS2 Terhadap Sub-spesies Kompleks. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia* 8(2): 174–184.
- Siagian FE, Bernardus JB, Adawiyah R, Maryanti E. 2017. Nyamuk: Peran Pola Gigit dan Pilihan Inang Dalam Kompetensi sebagai Vektor. *Jurnal Ilmu Kedokteran* 5(2): 71-81.
- Wijirahayu, S, Sukesi TW. 2019. Hubungan Kondisi Lingkungan Fisik dengan Kejadian Demam Berdarah Dengue di Wilayah Kerja Puskesmas Kalasan Kabupaten Sleman. *Jurnal Kesehatan Lingkungan Indonesia* 18(1): 19.
- Yen SW, Jean TP, Kiaw N, Othman AS, Bon LL, Boye A. 2013. Phylogeny of Asean *Homalomena* (Araceae) based on ITS Region Combined with Morphological and Chemical Data.. *Systematic Botany* 38(3): 589–599
- Yustinadewi PD, Yustiantara PS, 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): 105-111.