

**DESAIN PRIMER PCR SECARA *IN SILICO*
UNTUK AMPLIFIKASI GEN *COI*
PADA KUPU-KUPU *Papilio ulysses* Linnaeus
DARI PULAU BACAN**

Suparman¹, Hasna Ahmad², Zulkifli Ahmad²

¹Laboratorium Biologi FKIP Universitas Khairun-Ternate

²Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Khairun-Ternate

Email: suparman_bio@yahoo.com

Abstract

The insillico research was conducted to produce primer sequence of COI gene in Butterfly species Papilio ulysses from Bacan Island that will be used in gene isolation. The COI sub-unit I is a barcode gene that generally have special purposes in animal identification. It is also available in phylogenetic analysis. The first step of method is downloading the COI DNA sequence of Papilio ulysses from GeneBank (NCBI). Then the conserve region of COI sequence is identified to determine primer. Primer is designed with primer designer software (Genamics Expression) in two direction of DNA reading frame that are : forward primer (COI Pu-F) and reverse primer (COI Pu-R). The last step is primer confirmation with primer blast tool in NCBI. Primers of COI gene that are produced consist of two, that are CGAAAATGACTTTATTCAACA for forward primer (COI Pu-R) and AGCAGTAATTCCAACAGCTC for reverse primer (COI Pu-R). The optimal temperature of annealing is from 50,74⁰ to 55,74⁰ Celsius with PCR product around 567 base pair long.

Key Words : PCR primer, in silico, COI gene, Papilio ulysses, Bacan island.

Indonesia merupakan negara yang memiliki sumber kekayaan dan keanekaragaman hayati yang tinggi. Keanekaragaman hayati tersebut terdapat hampir disemua provinsi. Provinsi Maluku Utara salah satu provinsi dengan karagaman hayati yang tinggi baik dari tumbuhan maupun hewan. Keanekaragaman tersebut berada dalam berbagai jenis ekosistem yang tersebar di banyak pulau besar maupun kecil. Saat ini, Provinsi Maluku Utara secara administratif, terbagi dalam

Kabupaten/Kota yang terdiri dari Kota Ternate (Ternate), Kota Tidore Kepulauan (Soa Sio), Kabupaten Halmahera Barat (Jailolo), Kabupaten Halmahera Timur (Maba), Kabupaten Halmahera Utara (Tobleo), Kabupaten Halmahera Selatan (Bacan), Kabupaten Kepulauan Sula (Sanana), Kabupaten Pulau Morotai (Morotai), dan Kabupaten Taliabu. Salah satu Kabupaten yakni Halmahera Selatan memiliki ekosistem yang beragam baik pantai, hutan, maupun gunung. Selama ini

pendataan dan kegiatan eksplorasi flora dan fauna di kabupaten tersebut belum dilakukan secara komprehensif dan intensif. Di salah satu pulau terbesar, yakni Pulau Bacan terdapat kawasan Cagar Alam Gunung Sibela dengan luas ± 23.024 ha (BPS Halmahera Selatan, 2015) yang memiliki keanekaragaman jenis flora dan fauna cukup tinggi (Ahmad et al., 2015). Potensi sumberdaya alam yang terdapat di kawasan Cagar Alam Gunung Sibela, menjadikan kawasan ini sangat menarik untuk dikaji.

Berdasarkan hasil penelitian lebih lanjut, Ahmad et al., (2015) memaparkan bahwa telah terdapat berbagai jenis serangga. Secara rinci terdapat sebanyak 424 individu serangga yang terdapat di beberapa lokasi penelitian di Pulau Bacan dari 34 jenis kupu-kupu. Adanya berbagai jenis kupu-kupu di pulau Bacan dan sekitarnya, merupakan daya tarik tersendiri dan menambah eksotisme pada kawasan Cagar Alam Gunung Sibela.

Kupu-kupu di ekosistemnya berperan sebagai polinator dalam penyerbukan berbagai jenis bunga. Di sisi lain, kupu-kupu juga memberikan pesona dan keindahan pada alam dengan akulturasi warna pada tubuh dan sayapnya. Kupu-kupu sangat penting bagi keberlangsungan dan keseimbangan ekosistem, sehingga keberadaan kupu-kupu di alam menjadi salah satu indikator ekosistem. Penurunan jumlah populasi kupu-kupu di alam disebabkan oleh adanya alih fungsi hutan, penebangan liar, fragmentasi habitat, dan penangkapan liar. Salah satu cara untuk mempertahankan populasi kupu-kupu di alam adalah dengan melakukan eksplorasi jenis,

sosialisasi kepada masyarakat, dan melakukan penangkaran.

Beberapa genus kupu-kupu yang terdapat di Gunung Sibela Pulau Bacan yakni *Papilio*, *Ornithoptera*, *Troides* dan *Graphium*. Keempat genus tersebut berasal dari family Papilionidae. Salah satu jenis kupu-kupu yang teridentifikasi yakni *Papilio ulysses*. *Papilio Ulysses* adalah salah satu jenis kupu-kupu yang paling terkenal, secara umum dikenal pula dengan sebutan kupu-kupu biru atau kaisar biru (*blue emperor*). *Papilio ulysses* merupakan bagian dari kelompok kupu-kupu *peacock swallowtails* dan merupakan genus *Papilio* subgenus *Achillides* F.L. (Condamine, et al., 2012). Secara khusus species *Papilio ulysses* merupakan kupu-kupu endemik di sekitar kepulauan Maluku, Papua, Solomon, sampai Benua Australia (Condamine, et al., 2012). Gambar morfologi dan peta penyebaran endemik kupu-kupu *Papilio ulysses* tergambar pada gambar 1.

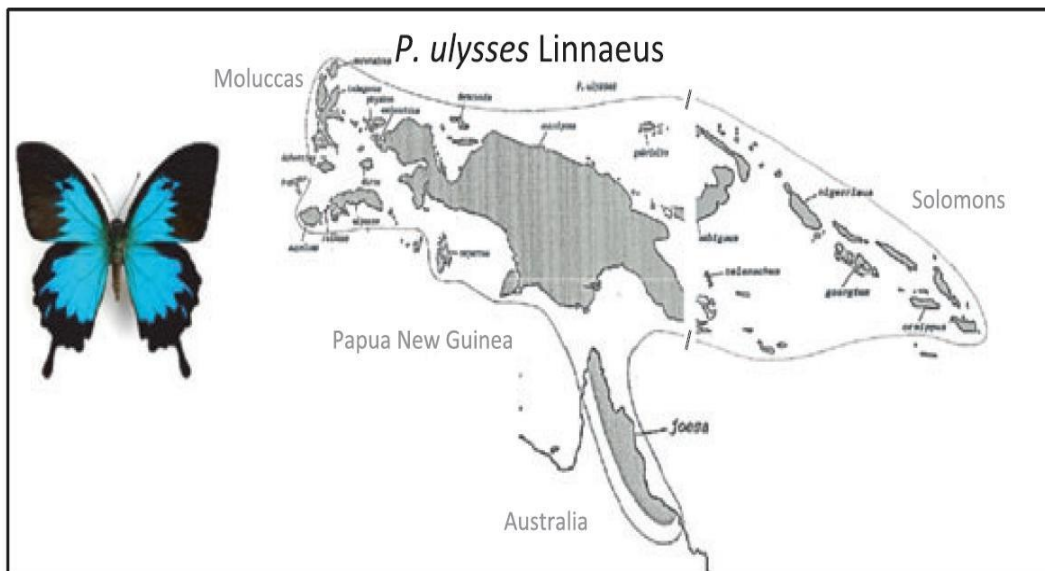
Kupu-kupu *Papilio ulysses* memiliki warna yang lebih menarik dibandingkan dengan jenis yang lainnya. Warna yang atratif dan mencolok tersebut menyebabkan kupu-kupu jenis ini menjadi buruan kolektor kupu-kupu.

Variasi yang luar biasa pada spesies ini menghasilkan banyak subspecies yang tersebar di daerah tersebut. Sampai saat ini, sebanyak 14 subspecies telah dikenali pada daerah penyebarannya (Braby 2000). Salah satu subspeciesnya ialah *Papilio u. joesa*, yang diakui sebagai subspecies endemik dengan penyebarannya yang terbatas di Australia serta jarang ditemukan (Sand dan New, 2002). Banyak dari spesies kupu-kupu yang

tidak dimiliki datanya secara lengkap mulai dari penyebaran dan jumlah perkiraan individu dari tiap spesies secara rinci. *Papilio ulysses* juga merupakan salah satu spesies yang masih sangat kurang data keberadaan jumlah dan kelimpahannya. Kekurangan data ini dapat menimbulkan kerugian besar secara imateri karena kepunahan yang tidak terduga dapat saja terjadi seiring dengan perubahan iklim global.

Informasi mengenai kupu-kupu spesies *P. ulysses* secara morfologi

dan variasinya masih terbatas dan kurang dalam publikasi oleh para peneliti lokal. Hal ini juga terjadi pada spesies lain dari genus *Papilio*. Salah satu publikasi oleh peneliti Indonesia mengenai spesies dari genus *Papilio* diantaranya ialah *Papilio polytes* oleh Makhzuni et al. (2013). Penelitian tersebut tentang variasi morfologi pada *Papilio polytes* dari beberapa lokasi yang berbeda di Sumatra Barat.



Gambar 1. Morfologi spesies *Papilio ulysses* dan peta penyebarannya meliputi Kepulauan Maluku, Papua, Solomon dan Australia (Condamine, et al., 2012).

Pada dasarnya data morfologi dan data genetika dari makhluk hidup sama pentingnya. Keduanya dapat saling melengkapi dalam identifikasi, analisis kekerabatan dan keperluan taksonomi makhluk hidup. Ketersediaan data genetika dianggap lebih praktis dalam penyimpanan karena tidak memerlukan ruang yang luas dan dapat disimpan dalam bank gen (gene bank). Data genetika juga diperlukan dalam mengantisipasi

ketiadaan data morfologi karena kelangkaan spesies atau spesies yang telah punah. Oleh karena itu diperlukan penelitian yang meliputi identifikasi, filogenetik, penyebaran, kelimpahan dan data ekologi *Papilio ulysses*. Penyediaan data genetik dapat dimulai dari data DNA *barcode* spesies makhluk hidup.

DNA *barcode* merupakan urutan pasangan basa “base pair” (bp) pada genom yang umumnya pendek

sekitar 650 bp (Hebert, et al., 2003). Pada kelompok Hewan, DNA *barcode*, biasanya menggunakan bagian dari genom mitokondria yakni gen *cytochrome c oxidase I* (COI). Hal ini dikarenakan gen COI umumnya memiliki kemampuan mutasi yang relatif cepat, sehingga dapat membedakan sampel pada tingkatan taksonomi yang lebih rendah misalnya spesies atau individu (Burns, et al., 2007). DNA Mitokondria (*mtDNA*) telah digunakan secara umum di kalangan peneliti dalam bidang molekuler khususnya sebagai penanda molekuler filogenetik pada kelompok hewan khususnya phypada. Hal ini juga disebabkan, mitokondria merupakan genom yang sangat sederhana. Urutan *mtDNA* telah menyediakan data-data penting dalam menganalisis filogenetik, sehingga pemilihan gen sebagai penanda molekuler merupakan langkah yang sangat signifikan. Oleh karena itu, urutan DNA dari gen tertentu sangat penting untuk didapatkan. Dalam hal identifikasi, urutan DNA dapat digunakan untuk menguji atau memastikan bahwa spesies yang di dapat merupakan objek yang diteliti, dalam hal ini *Papilio ulysses*. Hasil penemuan ini akan menjadi dasar yang sangat penting bagi penelitian-penelitian kupu-kupu *Papilio ulysses* yang khusus endemik di Pulau Bacan.

Untuk menghasilkan sepasang primer spesifik bagi gen COI pada *Papilio ulysses*, maka diperlukan informasi mengenai sekuen gen meliputi lokasi gen dalam kromosom, panjang pasangan basa, dan informasi spesifik mengenai susunan dan persentase basa pada gen tersebut. Kajian dan pengembangan informasi mengenai

primer DNA yang spesifik untuk proses amplifikasi dengan metode *Polymerase chain reactions* (PCR) untuk gen COI pada *Papilio ulysses* endemik Pulau Bacan belum pernah dilakukan. Penyediaan primer berdasarkan desain primer spesifik sangat diperlukan untuk penelitian selanjutnya. Penelitian berupa penelusuran tentang informasi sekuen gen COI *Papilio ulysses* yang menghasilkan desain primer spesifik COI yang akurat perlu sangat perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan menghasilkan urutan primer spesifik COI pada *Papilio ulysses* dengan menggunakan perangkat lunak komputer (*software*).

METODE

1. Penentuan DNA *Template*

Penelitian ini merupakan penelitian berbasis *in silico* dalam mendesain primer PCR dengan menggunakan analisis bioinformatika. Pengambilan dan pengolahan data yang tersedia pada website penyedia gen dan layanan pengolahan/analisis gen dan DNA. Proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) memerlukan sepasang primer sebagai pemicu terbentuknya DNA baru yang mirip gen target seperti proses replikasi DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Desain primer gen *COI* dimulai dengan mengunduh sekuen DNA gen *COI Papilio ulysses* yang tersedia di GenBank. Gen dikopi dalam bentuk pasta (.txt) dan dijadikan acuan untuk mencari daerah lestari. Primer yang dibuat yakni primer untuk dua arah pembacaan DNA yakni primer forward (*COI Pu -F*) dan primer reverse (*COI Pu-R*). Desain primer dibuat dengan ketentuan persentase GC

dari masing-masing primer harus di atas 50%, perbedaan suhu *melting* ideal antara kedua primer F dan R maksimal 4°C. Panjang masing-masing primer berkisar antara 15 basa sampai 25 basa. Desain primer juga harus menghindari struktur sekunder dan primer dimer (Claverie, & Notredame, 2007).

2. Desain primer gen *COI*

DNA primer diharapkan dapat menempel pada bagian ujung kedua urutan gen *COI*. Hal ini agar primer menghasilkan panjang gen hasil amplifikasi yang maksimal. Setelah mengikuti aturan tersebut, selanjutnya primer akan didesain dengan menggunakan software *primer designer* yakni *Genamics Expression* (<http://www.genamics.com/expression/order.htm>). Urutan primer yang telah dihasilkan selanjutnya akan dapat di ujicoba atau dikonfirmasi secara *insilico* menggunakan perangkat lunak *blast primer* pada NCBI untuk mengetahui posisi akurat penempelan primer pada gen *COI* secara bioinformatika.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. DNA *template* sebagai cetakan primer

DNA *template*/cetakan yang dijadikan acuan pada desain primer adalah sekuen gen *COI* yang terdapat di *genebank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bersumber dari publikasi (Condamine, et al, 2012). Nomor akses Nukleotida: gi|331271451| gb|JF681034.1| *Papilio ulysses* voucher CBGPFLC_00362 *cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, mitochondrial*. Sekuen secara lengkap adalah :

1 cgaaaatgac tttattcaac aatcataaa
gatattggaa cattatattt tattttgt

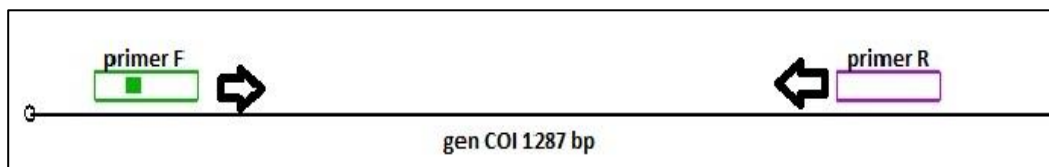
61 atttgagcaa gaatattagg aacttcatta
agtttattaa ttcgaactga attaggaacc
121 ccaggatctt taattggtga tgatcaaatt
tataatacta ttgttacagc tcatgctttt
181 attataattt tttttatagt tataccaatt
ataaattggag gatttggaaa ttgattagtt
241 cctctgatat taggagctcc tgatatagct
ttccccgaa taaataatat aagattttga
301 ttattacccccctcattaacacttttaatt tca
agaataa ttgtagaaaa tggagctgga
361 actggttgaactgtttatcccccttttca tc
aaacattg cccatggaag aagatcagta
421 gacttagtta ttttctcctt acatttagca
ggtatttctt caattttagg agcaattaat
481 tttattacaa caattattaa tatacgatt
aataatata catttgatca aataccttta
541 tttgtttgag ctgttggaaat tactgcttta
ttattacttc tttctttacc agtcttagca
601 ggtgctatta ctatattatt aacagatcga
aatttaaata catctttttt tgatcctgca
661 ggaggaggag atcctatttt atac aac
at ttattttgat ttttggta tccagaagtt
721 tatatttaa tttaccagg atttggaaata
atttctcata ttatttccca agaaagagga
781 aaaaagaaa catttgggtg tttaggt at
aatttatgctataataacaat tggattatta
841 ggatttttg tatgagctca tcatatattt a
ctgttggca tagatactga tacagagct
901 tattttacat cagcaacaat aattattgca
gtacctacag gaattaaat ttttagttga
961 ttagctactt tacacggaac ccaaattaat
tacagaccat caattttatg aagattagga
1021 tttgttttc ttttactgt aggaggatta
actggagtaa ttttagcaaa ttcacatcaatt
1081 gatgtaacct tacatgatac ttattatgta
gtagctcact tcattatgt tttatctata
1141 ggagctggtt ttgctattat aggaagatt
atcattgat atcctttatt tactggactt
1201 tcattaaatt cttacttttt aaaaattcaa
tttttacta tattattgg agtaaattta
1261 acatttttcc ctcaacattt tttagga

2. Urutan DNA primer yang dihasilkan

DNA *template* selanjutnya digunakan sebagai master untuk menjadi acuan primer dengan

software genamic expression. Pembentukan primer dapat digambarkan dengan ilustrasi DNA

dan primer dari dua arah seperti Gambar 2.



Gambar 2. Ilustrasi posisi *primer Forward* (F) dan *primer Reverse* (R) pada gen *COI*.

Primer *forward* dan *reverse* secara bersama dalam amplifikasi secara *invitro* akan menghasilkan urutan DNA COI parsial sepanjang 567 pasang basa. Penggunaan DNA parsial dalam pengenalan dan identifikasi jenis dapat dianggap sah. Dalam analisis kekerabatan makhluk hidup penggunaan DNA parsial juga telah banyak dilakukan, diantaranya pada analisis filogenetik tanaman mangga (Suparman, Pancoro, dan Hidayat, 2013). Pada kelompok hewan, DNA Parsial khususnya gen COI juga umum digunakan dalam analisis molekuler misalnya pada hewan kelompok Hemiptera (Habeeb & Sanjayan, 2011).

Pasangan primer hasil dari *software genamic expression* selanjutnya diujicoba dengan menggunakan fungsi *blast* primer yang ada pada NCBI. Fungsi *blast* ini merupakan simulasi secara insiliko yang menunjukkan urutan DNA yang akan dihasilkan bila sepasang primer tersebut digunakan untuk amplifikasi pada saat proses PCR dengan mengikuti profil yang diseting sesuai

dengan hasil desain primer tersebut. Simulasi tersebut akan mengenai target gen yang kita inginkan dalam hal ini gen COI *Papilio ulysses* jika data pada *genebank* telah tersedia gen yang dimaksud. Jika belum tersedia maka hasil *blast* primer akan mengenai gen yang lain yang cocok dan saling melengkapi dengan primer tersebut.

Hasil *blast* primer yang didapatkan dari fungsi *blast* primer NCBI dengan menggunakan primer hasil desain (*COI PU-F* dan *COI PU-R*) tergambar pada Gambar 3. Sekuen gen COI yang akan didapatkan berdasarkan PCR menggunakan primer tersebut ialah parsial gen COI yang panjangnya 567 pasang basa dari 1287. Penggunaan sekuen gen yang tidak utuh pada beberapa kajian dapat dilakukan misalnya pada analisis keragaman, analisis filogenetik atau identifikasi jenis pada hewan

Hasil *blast primer* adalah hasil pencarian gen yang telah tersedia di *genebank* dengan aplikasi yang disediakan oleh *website*, dalam hal ini *website* NCBI.

Primer pair 1								
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CGAAAATGACTTTATTCAACA	Plus	21	1	21	50.74	28.57	5.00
Reverse primer	AGCAGTAATCCAACAGCTC	Minus	20	567	548	55.74	45.00	4.00
Product length	567							
Products on intended target								
>JF681034.1 Papilio ulysses voucher CBGPFLC_00362 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial product length = 567 Forward primer 1 CGAAAATGACTTTATTCAACA 21 Template 1 21 Reverse primer 1 AGCAGTAATCCAACAGCTC 20 Template 567 548								
Primer pair 2								
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GACTTTATTCAACAATCATAAGA	Plus	25	8	32	52.41	24.00	7.00
Reverse primer	ACCAGTCCAGCTCCATTT	Minus	20	366	347	57.32	45.00	4.00
Product length	359							
Products on intended target								
>JF681034.1 Papilio ulysses voucher CBGPFLC_00362 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial								

Gambar 3. Hasil *blast primer* pada *website* NCBI.

Prinsip kerja *blast primer* secara sederhana mirip dengan amplifikasi dengan metode PCR. Perinsip dasarnya yakni primer yang telah dibuat akan menempel pada potongan-potongan gen yang telah ada di *genebank*. Penggunaan *blast primer* ini merupakan simulasi apakah potongan primer yang telah didesain mengenai sasaran gen yang ditargetkan.

Temperature Melting yang didapatkan merupakan hasil kalkulasi yang direkomendasikan oleh aplikasi *blast primer* dalam NCBI. Suhu tersebut sedikit berbeda dengan yang direkomendasikan oleh hasil kalkulasi dari *software* DNA calculator pada www.biophp.org. TM untuk *forward primer* hasil DNA cacultaor adalah 47,7 °C dan untuk *primer reverse*

52,8 °C. Hasil ini menunjukkan selisih sekitar 3-4°C.

Pada hasil kalkulasi persen GC untuk masing-masing primer dengan menggunakan DNA calculator www.biophp yakni sekuen *forward primer* adalah 28,6 % dan sekuen *reverse primer* adalah 45%. Hal ini bahwa hasil kalkulasi persen GC dari NCBI dan *biophp* menunjukkan kesamaan 100%. Perbedaan dan kesamaan pada dua indikator dengan menggunakan aplikasi yang berbeda dan dari sumber yang berbeda dalam pembuatan primer secara insiliko akan mendapatkan hasil yang sedikit perbedaan. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan uji coba awal dalam melakukan amplifikasi secara invitro untuk mendapatkan sekuen gen target yang sesuai dalam PCR menggunakan mesin PCR.

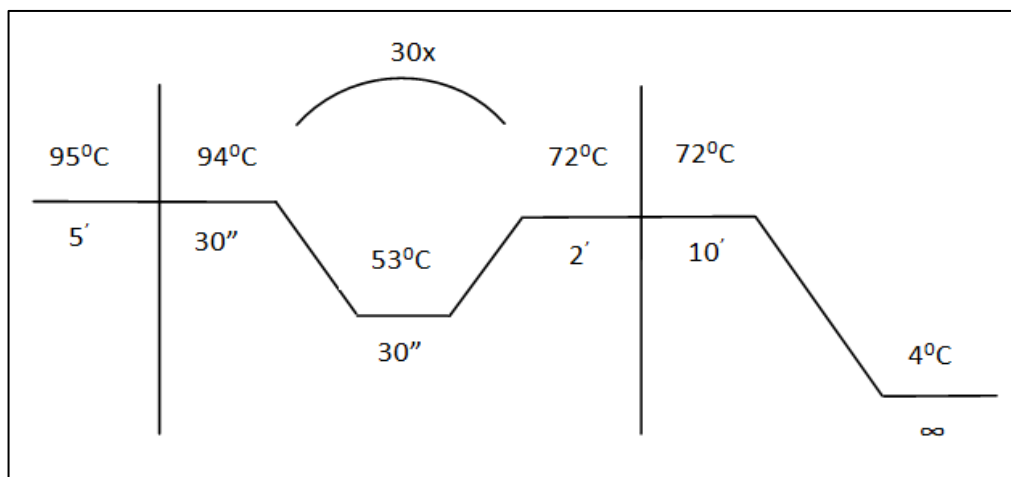
Tabel 1. Primer *Forward* dan *Reverse* (F dan R) yang didesain dengan software *genamic expression*.

Primer	Ukuran Basa	Panjang Produk basa	GC %	TM °C	Struktur Sekunder	Dimer
Forward (<i>COI PU-F</i>)	21	567	28,6	50,7	NONE	NO
Reverse (<i>COI PU-R</i>)	20	567	45,0	55,7	NONE	NO

*TM : *Temperature Melting* adalah suhu penempelan primer pada gen target.

Beberapa mesin PCR juga memiliki sensitifitas yang berbeda, sehingga secara umum kecocokan antara hasil kalkulasi aplikasi secara insiliko dengan invitro terkadang terdapat perbedaan. Perbedaan ini biasanya dapat diatasi dengan percobaan awal PCR. Berdasarkan

sekuen primer yang didesain dengan metode simulasi insiliko menggunakan *blast primer* pada NCBI, maka profil suhu prediksi amplifikasi gen *COI* untuk PCR dari genom kupu-kupu jenis *Papilio ulysses* diperkirakan sebagaimana tergambar dalam gambar 4.



Gambar 4. Desain profil suhu amplifikasi primer *COI* pada gen target.

Profil suhu pada gambar 4 dapat diartikan yakni : tahap persiapan denaturasi pada suhu 95°C selama lima menit. Tahap denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C yang dilanjutkan dengan *annealing* pada

suhu 53°C selama 30 detik. Tahap lanjutnya yakni pemanjangan hasil *annealing* DNA selama 2 detik pada suhu 72°C. Ketiga tahapan tersebut terjadi sebanyak 30x pengulangan yang dilanjutkan tahap akhir

pemanjangan pada suhu 72°C selama 10 menit. Suhu akhir 4°C adalah suhu penyimpanan setelah amplifikasi selesai.

Pengulangan basa/*repeats* pada primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa tetapi maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat ditoleransi. Misalnya ATATATAT. Primer juga sebaiknya tidak memiliki urutan basa yang diulang terus menerus. Pengulangan basa berurutan sampai 4 kali masih dapat ditoleransi. Misalnya AGCGGGGGATGGGG memiliki urutan basa G diulang 5 kali berturut-turut. Secara manual, suhu annealing optimum sangat mempengaruhi hasil PCR. Suhu Optimal ($T_a \text{ Opt}$) ini dapat dihitung dengan cara $T_a \text{ Opt} = 0.3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ of product}) - 25$. Penggunaan profil suhu PCR yang didapatkan akan sedikit berbeda pada mesin yang berbeda. Hal ini umumnya terjadi karena sensitifitas mesin dan alat yang digunakan juga berbeda. Perbedaan penting umumnya terjadi pada suhu *annealing*.

3. Panjang produk hasil PCR dan suhu optimal

Panjang basa produk hasil PCR ialah 567 bp. Panjang basa produk DNA target gen *COI* yang dihasilkan merupakan gen parsial yakni hanya 567 bp dari 1287 bp gen target pada *COI*. Ini merupakan hasil terpanjang dibandingkan dengan primer lainnya. Suhu *annealing* optimal diprediksikan antara 50-55 64 derajat celsius. Gen *COI* khususnya sub unit I merupakan salah satu gen yang umum dijadikan sebagai markah genetik atau barcode khususnya pada kelompok hewan. Aka tetapi, pada awalnya para ahli juga menggunakan gen *COI* dalam

rekonstruksi filogenetik pada tumbuhan, misalnya pada kelompok tumbuhan Araucariaceae (Setoguchi, *et al.*, 1998) atau pada Angiospermae secara umum (Barrachlough, *et al.*, 1996). Pada perkembangan selanjutnya, khusus pada tumbuhan digunakan penanda yang lebih spesifik pada genom kloroplas yakni gen *rbcL*, misalnya pada analisis filogenetik Genus Mangifera (Suparman, Pancoro, dan Hidayat 2013).

Dalam studi filogenetik molekuler, gen *COI* dapat digunakan dalam analisis karakteristik genetik antar dan intra spesies (Folmer, *et al.*, 1994). Sekuen DNA barcode memegang peran tambahan yang penting dalam alur kerja taksonomi sehingga barkoding DNA tidak dapat tergantikan untuk analisis taksonomi yang menyeluruh (Hajibabaei, Singer & Hickey, 2007). Sekuen DNA dari beberapa jenis tumbuhan atau dari beberapa spesimen dapat digunakan untuk rekonstruksi dan analisis filogenetika. Filogenetika merupakan satu bagian yang penting dalam analisis taksonomi yang menyeluruh, karena menyediakan informasi kekerabatan berdasarkan sejarah evolusi gen dan jenis dari masing-masing sampel.

Primer gen *COI* yang telah dibuat selanjutnya akan digunakan dalam amplifikasi gen *COI Papilio ulysess* dari beberapa sampel. Hasil amplifikasi tersebut selanjutnya digunakan untuk rekonstruksi pohon filogenetik yang dapat memberikan informasi kekerabatan berdasarkan urutan DNA gen *COI*. Hal ini tentu membutuhkan keakuratan dalam mendesain dan menghasilkan primer

gen *COI* sehingga menghasilkan produk PCR yang akurat.

4. Pemanfaatan sekuen DNA primer dan sekuen DNA *COI*

DNA primer sangat penting dalam rangkaian analisis DNA. Desain DNA primer merupakan langkah awal yang menentukan keberhasilan analisis DNA. Sekuen DNA primer akan digunakan dalam amplifikasi dengan metode PCR. Hasil sekuen gen yang didapatkan dapat dimanfaatkan dalam identifikasi spesies, taksonomy dan analisis kekerabatan.

Hasil sekuen DNA yang didapatkan pada jenis *Papilio ulysses* dari hasil PCR nantinya akan dapat digunakan sebagai pembanding dari data morfologi dalam indentifikasi jenis. Hal ini dikarenakan data morfology jenis kupu-kupu tersebut memiliki kesamaan yang tinggi dengan jenis lainnya berdasarkan pengamatan langsung. Dalam penelitian lebih lanjut, sekuen DNA gen *COI Papilio ulysses* yang dihasilkan dari proses PCR nanti dapat juga diajukan menjadi DNA *barcode* pada spesies tersebut.

Penyediaan sekuen DNA primer dalam konservasi genetik jenis makhluk hidup merupakan salah satu usaha konservasi secara tidak langsung dalam pelestarian jenis. Sekuen gen hasil amplifikasi dengan primer PCR yang baik akan menghasilkan sekuen gen yang akurat. Sekuen gen yang akan dihasilkan, dalam hal ini gen *COI Papilio ulysses* akan sangat membantu dalam usaha pelestarian dan konservasi jenis hewan endemik Pulau Bacan khususnya bagi jenis kupu-kupu.

SIMPULAN DAN SARAN

Primer gen *COI* sub unit I pada kupu-kupu *Papilio ulysses* yang optimal ialah CGAAAATGACTT TATTCAACA untuk primer *forward* dan AGCAGTAATTCCAACAG CTC untuk primer *reverse*. Suhu optimal berdasarkan perhitungan DNA calculator ialah 50,74-55,74 °C. Panjang Produk PCR yang diperkirakan ialah 567 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, H., Mas'ud, A., Ahmad, Z., 2015. Butterfly on the Island Bacan North Mollucas Province; How Density. *International Journal of Engineering Research and Development*. Volume 11, Issue 01:01-07
- Barrachlough, T.G., Harvey, P.H., & Nee, S. (1996) : Rate of *COI* gene sequences evolution and species diversification in flowering plants (Angiospermae). *The Royal Society. Proc. R. Soc. Lond. B* 263, 589-591.
- BPS Halmahera Selatan. 2015. *Halmahera Selatan Dalam Angka*. Badan Pusat Statistik Kabupaten Halmahera Selatan.
- Braby, M.F. (2000). *Butterflies of Australia: Their Identification, Biology and Distribution*. CSIRO Melbourne.
- Burns, J.M., Janzen, D.H., Hajibabaei, M., Halwachs, W., & Hebert, P. D. N., (2007). DNA Barcodes of Closely Related (But Morphologically And Ecologically Distinct) Species Of Skipper Butterflies (Hesperiidae)

- Can Differ By Only One To Three Nucleotides. *Journal Of The Lepidopterists' Society* : 61(3) :138–153
- Claverie, J.M., & Notredame, C. (2007) : *Bioinformatics for Dummies* 2nd edition. Wiley Publishing, Inc. Indianapolis.
- Condamine, F. L., Toussaint, E. F. A., Cotton, A.M., Genson, G.S., Sperling, F., A.H., Kergoat, G. J.,(2012) : Fine-scale biogeographical and temporal diversification processes of peacock swallowtails (*Papilio* subgenus *Achillides*) in the Indo-Australian Archipelago. *Cladistics* 1 : 1–24. 10.1111/j.1096-0031.2012.00412.x. The Willi Hennig Society.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoch, R. & Lutzand R. Vrijenhoek. (1994). *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. *Molecular Marine Biology & Biotechnology* 3(5):294-299.
- Habeeb, S.K.M., & Sanjayan, K.P., (2011). Sequencing And Phylogenetic Analysis Of The Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I Of *Xycarenus Laetus* (Hemiptera: Lygaeidae). *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(3): 85-92
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N & Hickey, D.A. (2007) : DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetic*.
- Handoyo. D., dan Rudiretna. A.,(2001). Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1): 17-29.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., & DeWaard, J.R., (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270: 313–321.
- Makhzuni, R., Syaifullah & Dahelm. 2013. Variasi Morfometri *Papilio polytes* L. (Lepidoptera: Papilionidae) di Beberapa Lokasi di Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA.)* 2(1): 50-56.
- Sands, D.P.A., & New, T.R. (2002) The Action Plan for Australian Butterflies, Environment Australia, Canberra.
- Setoguchi, H., Osawa, T.A., Pintaud, J.C., Jaffre, T. & Veillon, J.M., (1998) : Phylogenetic Relationships within Araucariaceae Based on *COI* Gene Sequences, *American Journal of Botany* 85(11): 1507–1516.
- Suparman, Pancoro, A., dan Hidayat, T., (2013). Phylogenetic Analysis of *Mangifera* base on *rbcL* sequences, Chloroplast DNA. *Scientific Papers-Series B, Horticulture*. LVII: 235-240.

