

Design and Specificity Test of Specific Primers for Neuroglobin Gene Expression Modulation in Brain Tissue of *Rattus norvegicus* using qRT-PCR

Bintang Fadhil Ramadhan¹, Muhammad Farikh¹, Muhammad Naufal Arrafi¹, Nagra Aulia Valofi¹, Walidatul Awaliyah¹, Jessi Rizkanauli Simangungsong¹, Dini Herisanti¹, Siska Alicia Farma^{1,2*}

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Padang, Indonesia.

²Center Research of Recycling and Organic Waste Management, Universitas Negeri Padang, Padang, Indonesia

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

ABSTRACT. Neuroglobin (Ngb) is a newly discovered globin that is found in large numbers in neurons. Brain cells are very sensitive to lack of oxygen and can begin to die within five minutes after the oxygen supply is cut off. Hypoxic conditions of brain tissue are ischemic in the area of the bleeding center. This study aims to design and test the specificity of the Neuroglobin *Rattus norvegicus* mRNA gene *in silico* as a nucleotide capable of reading neuroglobin gene expression. The neuroglobin gene sequence was obtained using a "nucleotide" search menu provided by NCBI GenBank and designed using Geneious Prime bioinformatics software. The neuroglobin gene sequence used in this study was *Rattus norvegicus* mRNA with accession number NM_033359.3|:1-1,773. Synthesized primary pairs are optimized using PCR gradients. PCR products were analyzed by electrophoresis using 1.5% agarose gel, 100 V for 27 minutes. The results obtained one forward primer for *Rattus norvegicus* neuroglobin (Ngb) which has a length of 20 bases with the order of 5' AGTCTTAGCCTCTCCCCAG -3' and reverse primer has a length of 20 bases with the order of 5' GTCTACAGAACCACGGCACAcx-3' product size 803 bp. The difference T_m in this pair of primers is 0.9 °C. The gradient PCR results showed the thickest and clearest DNA bands were at 57.7°C. Primers with the best primary criteria for neuroglobin genes were obtained with an amplicon size of 803 bp and an annealing temperature of 57.7 °C. The design results meet the requirements of good criteria so that the primary candidate design results can be used for the PCR process.

Keywords: *Hypoxia, Neuroglobin, Primer, Rattus norvegicus*

ABSTRAK. Neuroglobin (Ngb) adalah globin yang baru ditemukan dan banyak ditemukan dalam jumlah besar di neuron. Sel-sel otak sangat sensitif terhadap kekurangan oksigen dan dapat mulai terjadi kematian dalam waktu lima menit setelah suplai oksigen terputus. Kondisi hipoksia jaringan otak mengalami iskemik di daerah pusat peredaran. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan menguji spesifisitas gen Neuroglobin *Rattus norvegicus* mRNA secara *in silico* sebagai nukleotida yang mampu membaca ekspresi gen neuroglobin. Urutan gen neuroglobin diperoleh menggunakan menu pencarian "nukleotida" yang disediakan oleh NCBI GenBank dan dirancang menggunakan Geneious Prime perangkat lunak bioinformatika. Urutan gen neuroglobin yang digunakan dalam penelitian ini adalah

Rattus norvegicus mRNA dengan nomor aksesinya NM_033359.3|:1-1,773. Pasangan primer yang telah disintesis dioptimalkan menggunakan gradien PCR. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5%, 100 V selama 27 menit. Hasil penelitian memperoleh satu forward primer untuk *Rattus norvegicus* neuroglobin (Ngb) yang memiliki panjang 20 basa dengan urutan 5' AGTCTTAGCCTCTCCCCCAG -3' serta reverse primer memiliki panjang 20 basa dengan urutan 5' GTCTACAGAACCACGGCACA-3' ukuran produk 803 bp. Selisih T_m pada sepasang primer ini adalah 0,9 °C. Hasil PCR gradien menunjukkan pita DNA paling tebal dan pita DNA paling jelas berada pada suhu 57,7 °C. Primer dengan kriteria primer terbaik untuk Gen Neuroglobin didapatkan dengan ukuran amplicon 803 bp dan suhu annealing 57,7 °C. Hasil desain memenuhi syarat kriteria yang baik sehingga kandidat primer hasil desain dapat digunakan untuk proses PCR.

Kata kunci: *Hypoxia, Neuroglobin, Primer, Rattus norvegicus*



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2023 by author.

1. PENDAHULUAN

Neuroglobin (Ngb) adalah globin yang baru ditemukan dan banyak ditemukan dalam jumlah besar di neuron (Burmester et al., 2000). Ngb diekspresikan di neuron sistem saraf pusat dan perifer (SSP, PNS), serta di beberapa jaringan endokrin (Burmester et al., 2000). Sebagian besar neuron di CNS mengekspresikan Ngb, meskipun terdapat perbedaan kuantitatif antara populasi neuron yang berbeda. Ngb diekspresikan di sistem saraf pusat dan perifer, terutama di korteks otak, hippocampus, thalamus, hipotalamus dan cerebellum (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002).

Ngb diidentifikasi dengan memindai database sequencetag murine dan manusia yang diekspresikan untuk urutan globin parsial, kemudian dikloning, dan diurutkan untuk mengidentifikasi protein 151-aa dengan massa molekul yang diprediksi 17 kDa, yang ada sebagai monomer. Ngbs murine dan manusia menunjukkan 94% identitas urutan pada tingkat asam amino tetapi homologinya terbatas terhadap globin lain yang dikenal. Neuroglobin (Ngb) adalah globin monomer yang diekspresikan in neuron dan beberapa sel endokrin vertebrata, termasuk manusia. Seperti Mb dan Hb, Ngb mengikat O_2 dengan afinitas tinggi, menunjukkan peran yang dapat diterima dalam O_2 penyimpanan, transportasi, atau sensor. (Dewilde et al., 2001) Otak memiliki sekitar 170 miliar sel (Azevedo et al., 2009), yang mengkonsumsi rata-rata 516 kkal energi per hari, mewakili 22% dari total kebutuhan energi suatu organisme (Carmody & Wrangham, 2009). Sel-sel otak sangat sensitif terhadap kekurangan oksigen dan dapat mulai terjadi kematian dalam waktu lima menit setelah suplai oksigen terputus (Hundahl et al., 2006). Pada kondisi hipoksia jaringan otak mengalami iskemik di daerah pusat perdarahan dan dikelilingi oleh penumbra. Pada daerah iskemik terjadi kematian

sel, sedangkan di dalam penumbra diekspresikan gen secara selektif, termasuk gen Ngb dalam upaya untuk meningkatkan suplai oksigen (Shang et al., 2006).

Cedera jaringan sering dikaitkan dengan mobilisasi mekanisme molekuler dan seluler yang mempromosikan perbaikan. Peningkatan ekspresi Ngb tampaknya tidak menjadi respons universal terhadap semua bentuk kerusakan saraf karena setidaknya beberapa penghinaan tidak memicu respons yang sama. Namun, tidak satu pun respon terhadap hipoksia yang unik. Iskemik otak adalah rangsangan lain untuk ekspresi Ngb, meskipun temuan bervariasi tergantung pada model yang digunakan. Iskemik otak fokal paling jelas dikaitkan dengan induksi Ngb (Sun et al., 2001) mungkin karena melibatkan gangguan lengkap aliran darah dan hipoksia mendalam (Hundahl et al., 2006). Selain itu, Ngb juga memainkan peran pelindung dalam cedera otak iskemik-hipoksi (Sun et al., 2003).

Terkait mekanisme homeostatik di otak yang mendukung pemeliharaan mekanisme yang mempromosikan kelangsungan hidup sel pivotal telah sangat berharga untuk pengembangan strategi terapeutik untuk pengobatan cedera dan penyakit yang terkait dengan sistem saraf. Faktor penting dalam metabolisme seluler jaringan yang sangat aktif metabolisme ini adalah oksigen (O_2), pemain kunci dalam pertumbuhan sel dan kelangsungan hidup (Farma, 2020). Kedua regulasi ke atas dan ke bawah ketegangan O_2 memiliki fungsi otak defektif yang jelas. (Acker & Acker, 2004).

Dengan butuhnya pengekspresian gen Ngb, kami menggunakan salah satu dari banyak metode molekuler berbasis DNA, yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR memiliki keunggulan yaitu cepat dalam menganalisis hasil, memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Teknik PCR ini bertujuan untuk mengamplifikasi DNA dan terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama proses amplifikasi yang mana proses ini merupakan proses denaturasi untai DNA, kemudian dilanjutkan dengan pasangan primer yang menempel pada fragmen DNA target, dan terakhir ialah pemanjangan rangkaian DNA oleh DNA polymerase (Kadri, 2020). Pada Ngb urutan primer oligonukleotida diperoleh dari Primer-BLAST kemudian dianalisis lebih lanjut untuk mengidentifikasi primer yang paling efisien.

Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan menguji spesifisitas gen Neuroglobin *Rattus norvegicus* mRNA secara *in silico* sebagai nukleotida yang mampu membaca ekspresi gen neuroglobin.

2. METODE

Primer design

Urutan gen neuroglobin diperoleh menggunakan menu pencarian “nukleotida” yang disediakan oleh NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) dan dirancang menggunakan Geneious Prime perangkat lunak bioinformatika (<https://www.geneious.com>) (Achyar et al., 2021). Urutan gen neuroglobin yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari *Rattus norvegicus* mRNA dengan nomor aksesori NM_033359.3|:1-1,773. Urutan gen neuroglobin yang diperoleh disimpan dalam format FASTA untuk digunakan lebih lanjut di dalam proses desain silico primer menggunakan Geneious Prime. Setelah calon pasangan primer diperoleh, maka primer dipilih berdasarkan kriteria primer ideal (Shen et al., 2010; Hung & Weng, 2016). Kekhususan calon pasangan primer yang dihasilkan oleh Geneious Prime diperiksa menggunakan alat PrimerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Pasangan primer yang dipilih telah dipesan untuk disintesis di IDT, Singapura.

Gradient PCR

Pasangan primer yang telah disintesis dioptimalkan menggunakan gradien PCR untuk mendapatkan suhu annealing yang tepat. Suhu gradien telah diatur sesuai dengan Melting temperature (T_m) masing-masing primer. Komposisi PCR gradien reaksi yang digunakan dengan volume total 10 μ l terdiri dari 5 μ l 2x Campuran Merah MyTaq HS (Bioline), 1 μ l cDNA dari *Rattus norvegicus* (dibuat dari total RNA jaringan otak yang diekstraksi menggunakan Ribozol dan cDNA disintesis menggunakan kit cDNA Sensifast, Bioline), dan primer forward 0,5 μ M dan 0,5 μ M primer reverse. Reaksi PCR dibuat hingga 10 μ l dengan Nuclease free water. PCR dilakukan dengan ketentuan sebagai berikut (sesuai instruksi manual MyTaq HS Red Campur, Bioline): denaturasi awal pada 95°C sebesar 1 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 95°C selama 15 detik, suhu annealing pada gradien (57-58,7°C) selama 15 detik, dan perpanjangan pada 72°C selama 10 detik. PCR proses diakhiri dengan langkah perpanjangan pada 72°C selama 5 menit. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5%, 100 V selama 27 menit

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Software Geneious Prime menghasilkan dua pasangan kandidat primer untuk memperkuat gen mRNA di wilayah 920-1,722 urutan mRNA lengkap *Rattus norvegicus* neuroglobin (Ngb) (Gambar 1). Dua pasang primer dirancang oleh Primer-BLAST menunjukkan variabilitas dalam hal Ukuran produk PCR, panjang primer, T_m , dan GC persentase (Tabel 1). Produk yang dihasilkan oleh sepasang primer adalah 803 bp. Selanjutnya Melting temperature (T_m) pada pasangan primer berada pada suhu 57,1°C dan 58,0 °C.

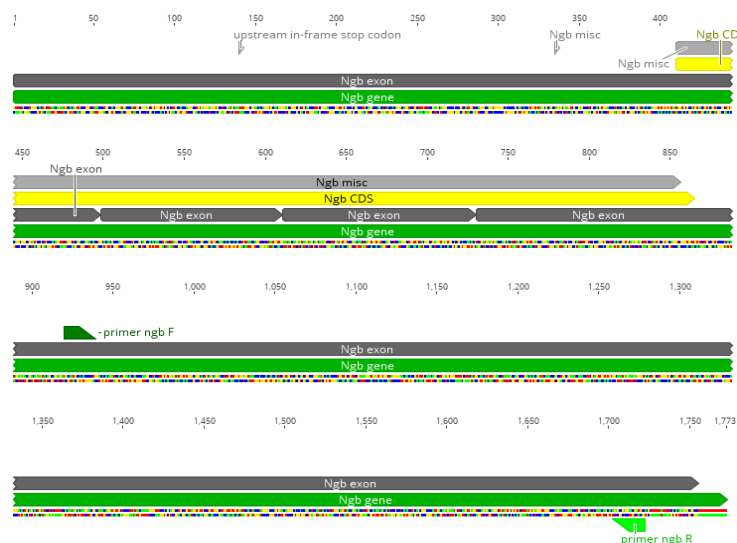
Urutan primer oligonukleotida diperoleh dari Primer-BLAST kemudian dianalisis lebih lanjut untuk mengidentifikasi primer yang paling efisien. Analisis untuk mengidentifikasi self-dimer, hairpin, repeat, dan run dilakukan dengan menggunakan Geneious Prime. Semua primer yang telah dianalisis menunjukkan hasil yang bervariasi dalam hal self-dimer, hairpin, repeat dan run (Tabel 1). Langkah pertama dalam proses tes PCR adalah desain primer dan ini akan menentukan amplifikasi kinerja tes PCR (Prajna, 2021). Faktor-faktor yang terdapat didalamnya meliputi panjang primer, melting temperature, persentase GC, dan berbagai kriteria lainnya, termasuk jumlah minimum self-dimer, hairpin, repeat, dan run, harus dipertimbangkan dianalisis secara tepat saat melakukan desain primer. (Saraswati et al., 2019; Pradnyaniti et al., 2013).

Desain primer harus mempertimbangkan sejumlah faktor, termasuk panjang primer, melting temperature (TM), proporsi basa GC, dan Self 3' komplementaritas. Dalam penelitian ini, primer yang dirancang menunjukkan panjang 20 basa untuk sepasang primer (Tabel 1). Secara teori, primer memiliki panjang sekitar 18-30 basa yang merupakan panjang primer yang ideal (Sasmito et al., 2014). Panjang primer PCR yang pendek akan menjadi rentan terhadap mispriming (kesalahan paste) sementara primer yang terlalu panjang dapat mengalami hibridisasi sehingga akan menghambat polimerisasi DNA proses (Anika et al., 2019). Hung & Weng (2016) juga menyatakan bahwa panjang primer yang baik adalah 18-24 nukleotida, karena primer terlalu pendek kurang spesifik. Dalam penelitian ini primer yang telah didesain berhasil dirancang dengan persentase GC yang berkisar 55 % hingga 60 % (Tabel 1). Persentase GC adalah faktor penting dalam merancang primer PCR. Persentasenya GC adalah jumlah guanin dan sitosin basa dalam primer yang mempengaruhi suhu melting (Tm). Selain itu, persentase GC juga berpengaruh terhadap pengikatan antar untai DNA. Persentase GC yang tinggi akan menyebabkan ikatan antar untai DNA menjadi kuat sehingga dibutuhkan waktu dan suhu yang lebih dibandingkan dengan AT. Selain itu, rendahnya kandungan GC pada primer akan mengakibatkan primer tidak dapat menempel dan akan berdampak pada penurunan efisiensi kerja PCR. Idealnya persentase kandungan GC berada pada kisaran tersebut sebesar 40 – 60% (Sasmito et al., 2014; Maitriani et al., 2015) 45-55% (Shen et al., 2010).

Table 1. Primer design results from Primer-BLAST

No	Sequences (5'--->3')	DNA Fold	Length (nt)	Tm (°C)	GC (%)	Hair pin	Amplification Size(bp)
1	Rattus norvegicus neuroglobin (Ngb) (NM_033359.3)_Forward AGTCTTAGCCTCTCCC CCAG		20	58	60	none	803
2	Rattus norvegicus neuroglobin (Ngb)(NM_033359.3)_Reverse GTCTACAGAACCACGG CACA		20	57,1	55	none	

Berdasarkan hasil desain primer pada Tabel 1, primer tersebut menunjukkan ciri-ciri primer yang baik untuk amplifikasi DNA menggunakan PCR. Primer yang didesain harus memenuhi kriteria primer ideal dengan panjang nukleotida 18-20 basa, selisih Tm (Melting temperature) antara primer forward dan reverse tidak lebih dari 5 °C, dan tidak membentuk struktur sekunder (hairpin atau self dimer). Primer pada Tabel 1, memang memiliki Tm yang cukup besar, namun bahkan jika ada peluang untuk dimerisasi diri, itu Tm untuk dimerisasi diri hanya 4 derajat, artinya bahwa pada saat analisa PCR, suhu yang digunakan adalah jauh lebih tinggi dari itu (95°C untuk denaturasi, 50-60°C untuk annealing, dan elongasi 72°C).



Gambar 1. Simulasi PCR satu pasang kandidat primer yang dirancang pada sekuens mRNA *Rattus norvegicus* neuroglobin (Ngb) (Nomor Akses NCBI: ref| NM_033359.3)

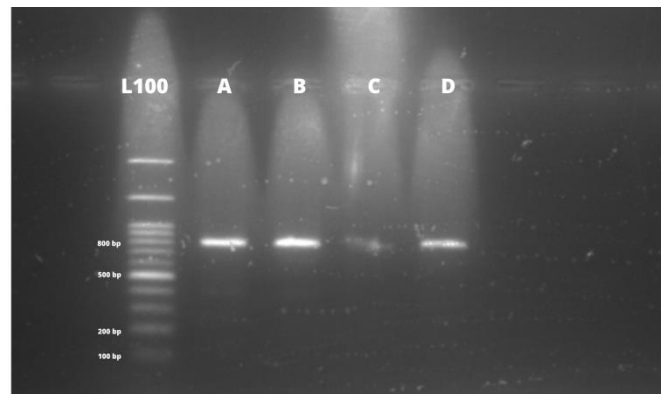
Hasil penelitian memperoleh satu forward primer untuk *Rattus norvegicus* neuroglobin (Ngb) yang memiliki panjang 20 basa dengan urutan 5' AGTCTTAGCCTCTCCCCCAG -3' serta reverse primer memiliki panjang 20 basa dengan urutan 5' GTCTACAGAACCACGGCACA-3' ukuran produk 803 bp. Selisih Tm pada sepasang primer ini adalah 0,9 0C. Hasil desain memenuhi syarat kriteria yang baik sehingga kandidat primer hasil desain dapat digunakan untuk proses PCR.

Primer specificity

Spesifisitas primer diperiksa secara *in silico* menggunakan NCBI primer BLAST. Hasil BLAST pasangan primer adalah dirangkum dalam Tabel 2. Pasangan primernya adalah diamplifikasi dalam genus *Rattus*, dan terdapat juga terdeteksi pada spesies lain. Kriteria terpenting yang harus dimiliki primer harus spesifik terhadap target (Ye et al., 2012). Idealnya, primer hanya akan menempel pada target yang diinginkan. Jika primer dapat terhubung ke target yang tidak diinginkan selama Amplifikasi DNA, hasil tesnya tidak akan bisa untuk mengidentifikasi spesies secara spesifik (Ye et al., 2012). Dari hasil Primer-BLAST yang terpilih pasangan primer, ditemukan bahwa primer bisa mengenali gen *Rattus norvegicus* neuroglobin yang terkandung di dalamnya basis data NCBI. Selain itu, primernya juga mengenali gen pada *Rattus rattus* dan *Apodemus sylvaticus* menunjukkan bahwa primer masih dapat menempel pada gen neuroglobin. Primer terpilih diuji menggunakan Geneious Perangkat lunak utama untuk menentukan keakuratan amplifikasi primer pada gen target. Primernya pasangan memperkuat gen neuroglobin dengan forward menempel ke nukleotida ke-920 hingga ke-939 dan primer reverse menempel ke 1,703 hingga 1,772 nukleotida.

Table 2. Primer specificity test generated by using Primer-BLAST

No	Target Template	Detect Target	Product Length	Accession Number
1	<i>Rattus norvegicus</i> neuroglobin (Ngb), mRNA	Yes	803	(NM_033359.3)
2	<i>Rattus rattus</i> neuroglobin (Ngb), mRNA	Yes	803	(XM_032908205.1)
3	<i>Apodemus sylvaticus</i> neuroglobin (Ngb)	Yes	787	(XM_052185335.1)
4	<i>Rattus tiomanicus</i>	No		
5	<i>Rattus tanezumi</i>	No		
6	<i>Rattus argentiventer</i>	No		
7	<i>Rattus rattus alexandrines</i>	No		
8	<i>Mus musculus</i>	No		
9	<i>Meriones unguiculatus</i>	No		
10	<i>Bandicota bengalensis</i>	No		



Gambar 2. PCR Gradient Test Results using Ngb_F & Ngb_R primers A: 57°C B: 57.7°C C: 58.2°C D: 58.7°C

Pasangan primer yang disintesis dioptimasi menggunakan PCR gradien untuk mendapatkan suhu annealing yang tepat. Suhu gradien telah diatur sesuai dengan Melting temperature (T_m) masing-masing primer. Hasil sintesis primer menunjukkan bahwa T_m primer ngb_Fwd adalah 58 °C, ngb_Rev adalah 57,1 °C, gradien suhu digunakan pada kisaran suhu 57,0 °C - 58,7 °C Hasil PCR gradien menunjukkan paling tebal dan pita DNA paling jelas berada pada suhu 57,7 °C. Berdasarkan hasilkan Gambar 2, suhu optimal ngb-Fwd & ngb-Rev urutannya adalah 57,7 °C seperti yang ditunjukkan pada huruf B. Ini adalah berdasarkan pita yang paling tebal dan sesuai ukuran amplicon. Hal ini menunjukkan bahwa primer dapat menempel pada suatu daerah cetakan DNA di a suhu 57,7 °C yang saling melengkapi urutan dasar.

KESIMPULAN

Didapatkan nukleotida primer yang dapat membaca ekspresi neuroglobin pada gen Neuroglobin *Rattus norvegicus* secara in silico. Kriteria primer terbaik untuk Gen Neuroglobin didapatkan dengan urutan basa primer foward dan reverse adalah 5'-AGTCTTAGCCTCTCCCCAG-3' dan 5'-GTCTACAGAACCACGGCACA-3'. Melalui optimasi primer didapatkan ukuran amplicon 803 bp dengan suhu annealing 57,7 °C. Hasil desain memenuhi syarat kriteria yang baik sehingga kandidat primer hasil desain dapat digunakan untuk proses PCR.

REFERENSI

Acker, T., & Acker, H. (2004). Cellular oxygen sensing need in CNS function: Physiological and pathological implications. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 207, Issue 18, pp. 3171–3188). <https://doi.org/10.1242/jeb.01075>

- Achyar, A., Atifah, Y., Putri, D.H., 2021. In silico study of developing a method for detecting pathogenic bacteria in refillable drinking water samples. *Journal of Physics: Conference Series* 1940 (1): 012061.
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neuro*
- Borah, P., 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision* 11(3): 134 -136. *logy*, 513(5), 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., & Hankeln, T. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 407(6803), 520–523. <https://doi.org/10.1038/35035093>
- Carmody, R. N., & Wrangham, R. W. (2009). The energetic significance of cooking. *Journal of Human Evolution*, 57(4), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2009.02.011>
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzza, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R., & Moens, L. (2001). Biochemical Characterization and Ligand Binding Properties of Neuroglobin, a Novel Member of the Globin Family. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38949–38955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106438200>
- Farma, S.A., Handayani, D. and Putri, D.H., 2020, August. Optimization of Annealing Temperature of HIF-1 A and 18s rRNA in Blood of Swimming Athletes Using RT-PCR. In International Conference on Biology, Sciences and Education (ICoBioSE 2019) (pp. 34-38). Atlantis Press.
- Hundahl, C., Kelsen, J., Kjær, K., Rønn, L. C. B., Weber, R. E., Geuens, E., Hay-Schmidt, A., & Nyengaard, J. R. (2006). Does neuroglobin protect neurons from ischemic insult? A quantitative investigation of neuroglobin expression following transient MCAo in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*, 1085(1), 19–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.040>
- Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science*, 147–164.
- Lorenz, T., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE Journal of visualized experiments*. 63, 1–15. doi: <https://doi.org/10.3791/3998>
- Praja, R. K. (2021). In silico oligonucleotide primer design for *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin B gene amplification. *Oceana Biomedicina Journal*, 53–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.30649/OBJ.V411.88>.
- Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T., & Hankeln, T. (2002). Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues.

Neuroscience, 115(3), 645–656. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00536-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00536-5)

- Saraswati, H., Seprianto, Wahyuni, F. D., 2019. Desain primer secara in silico untuk amplifikasi gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* isolat lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1),
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., Muhimmah, I., 2014. Karakteristik primer pada polymerase chain reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: mini review. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V, (5), 93–102. Magister Teknik Informatika, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Islam Indonesia. 33– 38.
- Shang, A., Zhou, D., Wang, L., Gao, Y., Fan, M., Wang, X., Zhou, R., & Zhang, C. (2006). Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia–reperfusion insults. *Brain Research*, 1078(1), 219–226.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.064>
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 898–905.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y., & Greenberg, D. A. (2001). *Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury*.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.251466698
- Sun, Y., Jin, K., Peel, A., Mao, X. O., Xie, L., & Greenberg, D. A. (2003). *Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo*.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0637726100
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L., 2012. PrimerBLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(134), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>