

## Multiple Alignment and Primer Design for Groups of Barnacle Organisms and *Amphibalanus amphitrite* as Biofouling Markers

Muhammad Farikh<sup>1</sup>, Rahmad Wanizal Pastha<sup>1</sup>, Aura Zahra Nafisah<sup>1</sup>, Rezeki Rival Alridho<sup>1</sup>, Bintang Fadhil Ramadhan<sup>1</sup>, Afifatul Achyar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Padang, Indonesia.

\*Correspondence author: [afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id](mailto:afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id)

**ABSTRACT.** *The impact caused by biota biofouling activities is the occurrence of corrosiveness and paralysis in installation buildings. To facilitate the installation and stability of biodiversity, researchers try to present environmental DNA (e-DNA) as environmental samples without killing and isolating an organism by utilizing environmental samples. This study aims to obtain a universal and specific primer of the Cytochrome Oxidase I (COX1) gene that can be used to identify biofouling barnacle groups designed in silico. The sequence used in this study was from Amphibalanus amphitrite mitochondria and Semibalanus balanoides with NCBI accession numbers NC\_024525.1|:1-1,551 and NC\_039849|:1-1,551. The sequence of COX1 sequences obtained was saved in FASTA format for further use in the primer design process using Geneious Prime. The determination of sustainable areas was determined using Benchling and Geneious Prime in the stages of multiple alignment. Sequence with the best specific primer criteria for COX1 A. amphitrite obtained with a length of 20-22 bases and an amplicon size of 910 bp. The sequence of forward and reverse primer bases were 5'-GAGCTGAACTTGGTCAACCG-3' and 5'-GCTCAAAGAAGAGGAGGGCTAT-3'. Sequence with best universal primer criteria of the barnacle group for COX1 were obtained with a length of 24 bases each and an amplicon size of 1,270 bp. The sequence of forward and reverse primer bases were 5'-GACTTCTACCGTTAATGTTAGGAG-3' and 5'-CTATGGTAATGAGGAGGAGTAGTG-3'. The design results meet the requirements of a good primer so that the primer candidate design results can be used for the PCR process.*

**Keywords:** *Biofouling, Barnacle, e-DNA, multiple alignment*

**ABSTRAK.** Biota pengotor atau *biofouling* adalah organisme hidup yang menempel pada suatu substrat. Dampak yang ditimbulkan oleh aktivitas biofouling biota adalah oleh karena sifatnya yang korosif sehingga dapat menyebabkan kelumpuhan pada bangunan instalasi. Untuk memfasilitasi instalasi dan kestabilan biodiversitas, peneliti mencoba menghadirkan environmental DNA (e-DNA) sebagai sampel lingkungan tanpa membunuh dan mengisolasi suatu organisme tersebut dengan memanfaatkan sampel lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer universal dan spesifik dari COX1 yang dapat digunakan untuk

mengidentifikasi biofouling kelompok Barnacle yang dirancang secara *in silico*. Sekuen organisme target yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNA mitokondria dari *Amphibalanus amphitrite*, *Amphibalanus reticulatus* dan *Semibalanus balanoides* dengan nomor akses NC\_024525, NC\_071896 dan NC\_039849.. Sekuen gen *COX1* yang diperoleh disimpan dalam format FASTA untuk digunakan lebih lanjut di dalam proses desain primer menggunakan Geneious Prime. Penentuan daerah lestari ditentukan dengan Geneious Prime dalam tahapan multiple alignment. Sekuen dengan kriteria primer spesifik terbaik untuk *COX1 A.amphitrite* didapatkan dengan panjang 20-22 basa dan ukuran amplicon 910 bp. Urutan basa primer foward dan reverse adalah 5'-GAGCTGAACTTGGTCAACCG-3' dan 5'-GCTCAAAGAAGAGGAGGGCTAT-3'. Sekuen dengan kriteria primer universal kelompok barnacle terbaik untuk *COX1* didapatkan dengan panjang masing-masing 24 basa dan ukuran amplicon 1.270 bp. Urutan basa primer foward dan reverse adalah 5'-GACTTCTACCGTTAATGTTAGGAG-3"dan 5'-CTATGGTAATGAGGAGGAGTAGTG-3'. Hasil desain memenuhi syarat kriteria primer yang baik sehingga kandidat primer hasil desain dapat digunakan untuk proses PCR.

**Kata kunci:** *Biofouling, Barnacle, e-DNA, multiple alignment*



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

Barnacle adalah kelompok organisme Macrofouling yang termasuk kedalam tipe hard fouling sebagai organisme pengotor penyebab utama kerusakan permukaan dari suatu substratnya (Callow & Callow, 2002; Railkin, 2004; Sorte, Williams & Zerebecki, 2010). Salah satu organisme penyebab biofouling utama adalah *Amphibalanus amphitrite* organisme kelompok barnacle. *A. amphitrite* merupakan salah satu hewan pengotor yang umum hidup menempel pada infrastruktur buatan manusia yang terendam di dalam perairan laut (Wijayanti *et al.*, 2020). Hal ini juga ditemukan pada permukaan buatan seperti lambung kapal, tiang pancang dan tembok laut. Biota pengotor atau biofouling adalah organisme hidup yang menempel pada suatu substrat (Toreh *et al.*, 2018). Kebanyakan biota di lautan akan mengalami pelagic larval duration atau melayang seperti plankton, tetapi ada saatnya dalam waktu tertentu biota ini mengalami fase sesil yang mencari substrat sebagai media penempelannya.

Dampak yang ditimbulkan oleh aktivitas biofouling biota adalah oleh karena sifatnya yang korosif sehingga dapat menyebabkan kelumpuhan pada bangunan instalasi. Perusahaan selalu mencari solusi yang jauh lebih ekonomis dan efisien dalam memonitoring biodiversitas apa saja yang terdapat di areanya. Dengan melakukan biomonitoring tersebut, pihak fabrikasi mampu memodelkan suatu kemungkinan bagaimana suatu instalasi tersebut mampu menjadi substrat terhadap perkembangan biota tanpa mengkhawatirkan kerugian yang ditimbulkan serta untuk mencapai agar biodiversitas tetap stabil dan terjaga sesuai dengan ekologiannya.

Maka dari itu, untuk mempermudah instalasi dan kestabilan biodiversitas, peneliti mencoba menghadirkan environmental DNA (e-DNA) sebagai sampel lingkungan tanpa membunuh dan mengisolasi suatu organisme tersebut dengan memanfaatkan sampel lingkungannya seperti air, tanah atau feses. Metabarcoding DNA lingkungan (e-DNA) adalah metode baru untuk menilai keanekaragaman hayati dimana sampel diambil dari lingkungan melalui air, sedimen atau udara dari mana DNA diekstraksi, dan kemudian diamplifikasi menggunakan primer spesifik atau universal dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

DNA mitokondria (mtDNA) menjadi pilihan untuk mempelajari taksonomi, populasi dan evolusi hewan. Beberapa aspek struktur dan evolusi menyebabkan mtDNA menjadi pilihan, antara lain: memiliki banyak salinan (*copy*) dalam sel sehingga memudahkan untuk memperoleh sampel yang diinginkan, tidak mengalami rekombinasi sehingga tidak dikacaukan oleh perubahan genetik akibat rekombinasi, memiliki daerah terkonservasi antar taksa sehingga dapat dijadikan sebagai *template* untuk desain primer yang bersifat universal, sekaligus daerah yang bervariasi laju evolusinya (Bernasconi *et al.*, 2001; Caccone *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2000). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu pendekatan biologi molekuler yang digunakan untuk otentikasi dan deteksi spesies yang diinginkan seperti kelompok barnacle dengan cara mengamplifikasi sekuens spesifik spesies dalam genom seperti fragmen mt-DNA gen yang mengkode cytochrome c oxidase subunit I (COX1). Gen COX1 memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam menentukan identitas spesies hampir di semua hewan tingkat tinggi. Banyak kelebihan dari gen COX1 dalam mempelajari karakteristik genetik, hal ini karena gen COX1 sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya dan terdapat banyak pula bagian yang *conserved* (lestari) sehingga bisa digunakan sebagai DNA metabarcoding di sebagian besar spesies.

Keberhasilan memperbanyak salinan fragmen DNA pada metode PCR sangat tergantung pada primer yang digunakan. Primer adalah salah satu komponen yang berperan penting dalam proses PCR. Primer adalah nukleotida yang berukuran 18-30 nt dan digunakan untuk membatasi fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Astari *et al.*, 2021). Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diperbanyak sekaligus menyediakan gugus hidroksil (OH<sup>-</sup>) pada ujung 3' yang dibutuhkan untuk proses ekstensi DNA. Sepasang primer harus mempunyai karakter yang baik agar dapat menempel pada gen target. Rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan maksimal sehingga menyebabkan produk PCR tidak spesifik dan atau terbentuk primer dimer.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer universal dan spesifik dari gen cytochrome c oxidase subunit I (COX1) yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan organisme penyebab biofouling kelompok barnacle yang dirancang secara *in silico*. Hasil rancangan primer tersebut bisa digunakan dalam proses amplifikasi PCR dari sampel e-DNA.

## 2. METODE

### **Pengunduhan Sekuen DNA Template**

Urutan sekuen *COX1* organisme target diperoleh menggunakan menu pencarian “nukleotida” yang disediakan oleh NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/-genbank/>) dan dirancang menggunakan perangkat lunak bioinformatika Geneious Prime (<https://www.geneious.com>) (Achyar *et al.*, 2021). Sekuen organisme target yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNA mitokondria dari *Amphibalanus amphitrite*, *Amphibalanus reticulatus* dan *Semibalanus balanoides* dengan nomor akses NC\_024525, NC\_071896 dan NC\_039849. Sekuen *COX1* yang diperoleh disimpan dalam format FASTA untuk digunakan lebih lanjut di dalam proses desain primer. Setelah calon pasangan primer diperoleh, maka primer dipilih berdasarkan kriteria primer ideal.

### **Multiple Alignment dan Desain Primer**

Multiple alignment dilakukan menggunakan ketiga sekuen *COX1* yang sudah diunduh dari NCBI menggunakan Geneious Prime. Daerah yang lestari (conserved) dijadikan sebagai kandidat untuk mendesain primer universal kelompok Barnacle, sedangkan daerah yang variabel dijadikan sebagai kandidat untuk mendesain primer spesifik. Primer spesifik yang didesain pada penelitian ini adalah untuk *A. amphitrite* karena jenis ini yang paling sering ditemukan pada instalasi bangunan di laut.. Primer dirancang menggunakan Geneious Prime secara manual berdasarkan daerah conserved dan daerah spesifik untuk *A. amphitrite* pada bagian ujung 3' primer. Kemudian primer dipilih berdasarkan kriteria yang memenuhi primer ideal (Shen *et al.*, 2010; Hung & Weng, 2016).

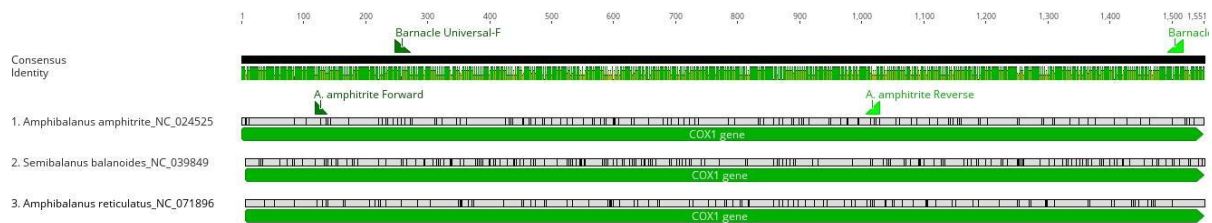
### **Uji Spesifisitas Primer**

Spesifisitas kandidat calon pasangan primer yang dihasilkan oleh Geneious Prime diperiksa menggunakan tools Primer-BLAST di situs NCBI dengan cara memasukkan sekuen primer forward dan reverse (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Software Geneious Prime menghasilkan dua pasangan kandidat primer untuk mengamplifikasi sekuen *COX1* Barnacle sebagai primer universal di wilayah 248-1.517 dan mengamplifikasi sekuen *COX1 A.amphitrite* sebagai primer spesifik di wilayah 119-138 (Gambar 1). Dua pasang primer hasil desain menunjukkan variabilitas dalam hal ukuran

produk PCR, panjang primer,  $T_m$ , dan %GC (Tabel 1). Amplikon yang dihasilkan oleh pasangan primer Barnacle universal adalah 1.270 bp untu dan 910 bp untuk pasangan primer spesifik *A. amphitrite*. Selanjutnya *melting temperature* ( $T_m$ ) pada pasangan primer berada pada suhu 56°C - 59.1°C. Pada penelitian ini digunakan pensejajaran sekuen DNA dari beberapa spesies hasil BLAST dengan tingkat similaritas tinggi. Spesies *Amphibalanus amphitrite* yang digunakan sebagai spesies patokan pada proses multiple alignment, ditentukan terlebih dahulu sekuen Coding domain Sequence (CDS) nya dari data NCBI. Hasil alignment COX1 *Amphibalanus amphitrite* dengan gen COX1 dari spesies lainnya menunjukkan adanya kesamaan sequence yang cukup tinggi pada daerah Coding Domain Sekuense (CDS). Kesamaan sekuens tersebut menunjukkan adanya sekuens yang terkonservasi sehingga dapat dijadikan acuan untuk dibuat desain primer DNA bagi spesies biofouling kelompok barnacle.



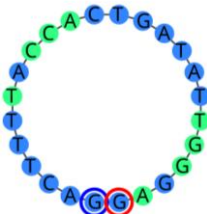
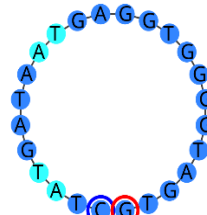
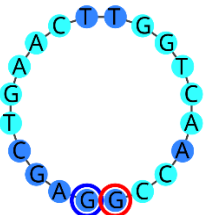
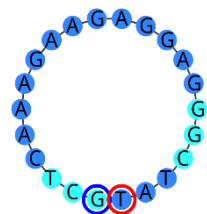
Gambar 1. Simulasi PCR dua pasang kandidat primer yang dirancang pada multiple alignment sekuen COX1 *A. amphitrite* (NC\_024525), *A. reticulatus* (NC\_071896), dan *S. balanoides* (NC\_039849)

Urutan primer oligonukleotida yang diperoleh 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 (Praja, 2021). Faktor-faktor yang terdapat didalamnya meliputi panjang primer, *melting temperature*, persentase GC, self 3' complementarity dan berbagai kriteria lainnya, termasuk jumlah minimum *self-dimer*, *hairpin*, *repeat*, dan *run*, harus dipertimbangkan dianalisis secara tepat saat melakukan desain primer (Saraswati dkk. 2019; Pradnyaniti dkk. 2013).

Dalam penelitian ini, dua pasang primer yang dirancang menunjukkan panjang 20-24 basa (Tabel 1). Secara teori, primer memiliki panjang sekitar 18-30 nt basa yang merupakan panjang primer yang ideal (Astari *et al.*, 2021). 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).

Dalam penelitian ini primer yang telah didesain berhasil dirancang dengan persentase GC yang berkisar 41,7% hingga 55% (Tabel 1). Persentase GC adalah faktor penting dalam merancang primer PCR. Persentase GC adalah jumlah basa guanin dan sitosin dalam primer yang mempengaruhi suhu *melting* ( $T_m$ ). 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 dkk. 2014; Maitriani dkk. 2015) 45-55% (Shen dkk. 2010).

Tabel 1. Hasil Desain Primer dengan Geneious Prime

No	Sequences (5'--->3')	DNA Fold	Length (nt)	$T_m$ (°C)	GC (%)	Hair pin	Amplicon Size(bp)
1	<i>Amphibalanus amphitrite</i> , mitochondrion COX1 (NC_024525.1)_Forward GAGCTGAACTTGGTCA ACCG		20	59,1	55	none	803
2	<i>Amphibalanus amphitrite</i> , mitochondrion COX1 (NC_024525.1)_Reverse GCTCAAAGAAGAGGAG GGCTAT		22	59,6	55	none	
3	Primer Universal Barnacle, mitochondrion COX1_Foward GACTTCTACCGTTAATG TTAGGAG		24	56,6	41,7	none	1,270
4	Primer Universal Barnacle, mitochondrion COX1_Reverse CTATGGTAATGAGGAG GAGTAGTG		24	57,4	45,8	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 18-30 basa, selisih Tm antara primer forward dan reverse tidak lebih dari 5 °C, dan tidak membentuk struktur sekunder (hairpin atau self dimer).

Hasil penelitian memperoleh satu forward primer untuk *Amphibalanus amphitrite* yang memiliki panjang 20 basa dengan urutan 5' GAGCTGAACTTGGTCAACCG -3' serta reverse primer memiliki panjang 22 basa dengan urutan 5' GCTCAAAGAAGAGGAGGGCTAT -3' ukuran produk 910 bp. Selisih Tm pada sepasang primer ini adalah 0,5°C. Hasil penelitian juga memperoleh satu forward primer universal untuk kelompok barnacle organisme biofouling yang memiliki panjang 24 basa dengan urutan 5' GACTTCTACCGTTAATGTTAGGAG -3' serta reverse primer memiliki panjang 24 basa dengan urutan 5' CTATGGTAATGAGGAGGAGTAGTG -3' ukuran produk 1,270 bp. Selisih Tm pada sepasang primer ini adalah 0,8°C. Hasil desain memenuhi syarat kriteria yang baik sehingga kandidat primer hasil desain dapat digunakan untuk proses PCR.

### Spesifisitas Primer

Spesifisitas primer diperiksa secara *in silico* menggunakan NCBI primer-BLAST. Hasil BLAST pasangan primer dirangkum dalam Tabel 2. Pasangan primernya adalah diamplifikasi dalam genus *Amphibalanus* untuk primer spesifik, dan kelompok barnacle untuk primer universal serta terdapat juga terdeteksi pada spesies lain.

Tabel 2. Hasil Uji Spesifisitas Secara In Silico Dengan Primer-BLAST

No.	Target Template	Primer Spesifik <i>A. amphitrite</i>		Primer Universal Barnacle		NCBI Accession Number
		Terdeteksi	Ukuran Amplikon	Terdeteksi	Ukuran Amplikon	
1	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	Ya	910 bp	Ya		NC_024525.1
2	<i>Amphibalanus improvisus</i>	Tidak	-			
3	<i>Amphibalanus eburneus</i>	Tidak	-			
4	<i>Amphibalanus reticulatus</i>	Tidak	-	Ya	1270	NC_071896.1
5	<i>Amphibalanus zhujiangensis</i>	Tidak	-			
6	<i>Amphibalanus variegatus</i>	Tidak	-			
7	<i>Amphibalanus subalbidus</i>	Tidak	-			

8	<i>Amphibalanus cirratus</i>	Tidak	-			
9	<i>Semibalanus cariosus</i>	Tidak	-	Ya	1270	NC_050836.1
10	<i>Notochthamalus scabrosus</i>	Tidak	-	Ya	1270	KF425564.1
11	<i>Pollicipes polymerus</i>	Tidak	-	Ya	1270	NC_005936.1
12	<i>Semibalanus balanoides</i>	Tidak	-			
13	<i>Balanus trigonus</i>	Tidak	-			
14	<i>Catomerus polymerus</i>	Tidak				
15	<i>Tetraclita serrata</i>	Ya	910	Ya	1270	NC_029154.1
16	<i>Balanus trigonus</i>	Ya	910	Ya	1270	MW646099.1

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 spesifik, ditemukan bahwa primer bisa mengenali sekuen *Amphibalanus amphitrite* yang terkandung di dalamnya basis data NCBI dan pasangan primer universal ditemukan bahwa primer bisa mengenali kelompok organisme barnacle yang terkandung di dalamnya basis data NCBI. Primer terpilih diuji menggunakan Geneious Prime untuk menentukan keakuratan amplifikasi primer pada sekuen target. Pasangan primer spesifik memperkuat sekuen COX1 dengan forward menempel ke nukleotida ke-119 hingga ke-138 dan primer reverse menempel ke 1,007 hingga 1,028 nukleotida. Pasangan primer universal memperkuat sekuen COX1 dengan forward menempel ke nukleotida ke-248 hingga ke-271 dan primer reverse menempel ke 1,494 hingga 1,517 nukleotida.

## KESIMPULAN

Primer dengan kriteria primer spesifik terbaik untuk COX1 *Amphibalanus amphitrite* didapatkan dengan panjang 20-22 base dan ukuran ampikon 910 bp. Urutan basa primer forward dan reverse adalah 5'- GAGCTGAACTTGGTCAACCG -3' dan 5'- GCTCAAAGAAGAGGAGGGCTAT -3'. Primer dengan kriteria primer universal kelompok barnacle terbaik untuk COX1 didapatkan dengan panjang masing-masing 24 base dan ukuran ampikon 1,270 bp. Urutan basa primer forward dan reverse adalah 5'- GACTTCTACCGTTAATGTTAGGAG -3' dan 5'- CTATGGTAATGAGGAGGAGTAGTG -3'. Hasil desain memenuhi syarat kriteria yang baik sehingga kandidat primer hasil desain dapat digunakan untuk proses PCR.



## REFERENSI

- 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.
- Astari, D. D., Dewi, S. G., 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. *Fullerene Journal of Chemistry*, 6(2), 110-117.
- Anika, M., Putri, D. H., Wahyuni., 2019. Primer design for identification of beta-carotene encoding genes in cassava. *Serambi Biologi*, 4(1), 39–47.
- Callow, M.E. & Callow, J.A. 2002. Marine biofouling : a sticky problem. *Biologist*. *Biologist*, 49(1), 1-5
- 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.V4I1.88>.
- Railkin, A.I. 2004. Marine biofouling : colonization processes and defenses. *CRC Press*.
- 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.
- Sorte, C.J.B., Williams, S.L. & Zerebecki, R.A. (2010). Ocean warming increases threat of invasive species in a marine fouling community. *Ecology*, 91(8).
- 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](http://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](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0637726100)
- Toreh, P. T., Mamangkey, N. G. F., Boneka, F. B., Kussen, J. D., & Lumuindong, F. (2018). Species Inventory and Weight Measurements of Biofoulings Attached on the Pearl Oyster, *Pinctada margaritifera*, from Arakan Waters, North Sulawesi. *Jurnal Ilmiah PLATAX*, 6(2), 106-113.
- Wijayanti, H., Herbowo, D. G., & Darmawan, A. (2020). Keberadaan Hewan Pengotor Teritip di Infrastruktur Teluk Kunyit, Pantai Sariringgung dan Pantai Mutun, Lampung. *Jurnal Biologi Tropis*, 20(1), 54-58.
- 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>