

Alternatif *Practice From Home* saat Pandemi Covid-19 dalam Mata Kuliah Biologi Molekular: Desain-Primer Menggunakan *PerlPrimer* dan *Primer-BLAST*

Jihan Farhah Huwaidah¹, Alim Aulia Hana¹, Mafrukhatun Ni'mah¹, Arini Mayang Fa'uni¹, Fiqih Fallahian¹, Tia Aulia¹, Yuanita Rachmawati^{1,2}, Lailatul Amalia Nugrahani^{1*}

¹Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Ampel Surabaya

²Pendidikan IPA, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, UIN Sunan Ampel Surabaya

*email: lailatulamalian@gmail.com

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:

Diasporus diastema, Gen COI, *PerlPrimer*, *Primer-BLAST*, NCBI

The COVID-19 Pandemic has greatly impacted various sectors, one of sector which is the education sector. Education activity can be carried out by using online technology. These alternative activities can be channeled by carrying out a primer design using software PerlPrimer and on the COI gene. The purpose of this research is to apply online technology in molecular biology learning using PerlPrimer software and Primer-BLAST feature on the NCBI site to find out how to get the best primary sequences. The method used to design primers and perform comparisons perlprimer by downloading fasta on the COI Diasporus diastema gene from GenBank: KT186586 which was selected in the NCBI database (The National Center for Biotechnology Information). The results obtained using Primer-BLAST feature on the NCBI site are more recommended to get the best primary design compared to using PerlPrimer software.

Kata Kunci:

Diasporus diastema, Gen COI, *PerlPrimer*, *Primer-BLAST*, NCBI

Adanya pandemi COVID-19 sangat berdampak pada berbagai sektor, salah satunya adalah sektor pendidikan. Kegiatan pendidikan dapat terlaksana dengan adanya teknologi daring. Alternatif kegiatan tersebut dapat tersalurkan dengan melakukan desain primer menggunakan *software PerlPrimer* dan *Primer-BLAST* pada Gen COI. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk menerapkan teknologi daring dalam pembelajaran biologi molekular dengan menggunakan *software PerlPrimer* dengan fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI agar dapat mengetahui cara mendapatkan sekuens primer terbaik. Metode yang digunakan untuk mendesain primer dan melakukan pembandingan *PerlPrimer* dengan cara mengunduh fasta pada gen COI *Diasporus diastema* dari GenBank: KT186586 yang dipilih pada database NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Hasil yang didapatkan penggunaan fitur *Primer-BLAST* yang ada pada situs NCBI lebih direkomendasikan untuk mendapatkan design primer terbaik dibandingkan dengan menggunakan *software PerlPrimer*.

PENDAHULUAN

Tatanan kehidupan sosial masyarakat telah berubah sejak terjadinya pandemi COVID-19. Hal tersebut merupakan faktor eksternal yang menjadi pengaruh terhadap pembelajaran saat ini (Strielkowski, 2020; Saraswati & Mertayasa, 2020). Aktivitas pembelajaran tatap muka tidak memungkinkan pada kondisi saat ini, sehingga dilakukan pembelajaran yang membatasi kontak fisik antar pendidik dan pelajar. Dampaknya, dominan dirasakan pada pembelajaran sains yang membutuhkan kegiatan praktikum di laboratorium (Saraswati & Mertayasa, 2020). Mahasiswa yang mempelajari sains, bukan hanya memerlukan pemahaman dengan konsep, fakta, dan teori, tetapi juga perlu melakukan kegiatan praktikum. Praktikum dilakukan untuk menemukan hasil penelitian dari pemahaman konsep, fakta, dan teori yang diajarkan (Hamidah, 2014; Mardhotillah *et al.*, 2020).

Biologi molekular adalah cabang biologi yang kegiatan pembelajarannya diperlukan ketelitian dalam penelaahan, pembahasan, serta prosedur laboratorium yang menyangkut tentang beragam kejadian biologis pada organisme di tingkat molekul. Hal tersebut menyebabkan dibutuhkannya pendukung aktivitas mahasiswa yang berupa fasilitas selama kegiatan pembelajaran dalam menerapkan konsep biologi molekular (Suryanti dkk, 2019). Teknologi daring hadir untuk membantu para pelajar melaksanakan kegiatan pendidikannya di dalam rumah. Hal tersebut dikarenakan teknologi daring mudah dilaksanakannya serta dapat dijangkau oleh banyak orang (Saraswati & Mertayasa, 2020). Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk menerapkan teknologi daring dalam pembelajaran biologi molekular dengan menggunakan *software* *PerlPrimer* dengan fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI agar dapat mengetahui cara mendapatkan sekuens primer terbaik.

Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal dan tersusun atas 30 basa. Keberhasilan dalam melakukan *sequencing* DNA merupakan hasil dari faktor desain primer yang tepat. Desain primer

juga menjadi faktor penting dalam membuat alat PCR yang spesifik, efektif dan efisien bagi peneliti maupun klinisi. Desain primer yang digunakan untuk PCR yaitu sepasang primer yang dikenal dengan *forward primer* dan *reverse primer*. Tiap penelitian panjang primer yang digunakan juga berbeda-beda tetapi tetap meminimalkan ukuran primer (Sasmito dkk, 2014).

Gen COI (*cytochrome oxidase subunit I*) adalah salah satu gen dalam DNA mitokondria (mtDNA) yang dapat dipakai untuk penanda genetik agar memudahkan dalam mempelajari karakteristik antar spesies maupun individu. Hampir semua proses identifikasi hasil pemuliaan hewan baik intraspecies maupun interspecies menggunakan penanda Gen COI. Gen COI memiliki kemampuan mutasi yang cepat sehingga dapat membedakan sampel pada tingkat taksonomi yang lebih rendah seperti spesies. (Hebert dkk, 2003; Suriana dkk, 2019). Pada artikel ini, gen yang digunakan berasal dari spesies *Diasporus diastema*. *Diasporus diastema* (*Eleutherodactylidae*) adalah aboreal umum, spesies nokturnal yang mendiami hutan lembab. Spesies ini biasanya ditemukan di hutan tua, selain itu juga ditemukan di fragmen hutan dan di habitat yang terganggu. *Diasporus diastema* sulit ditemukan karena tempatnya yang tersembunyi dari vegetasi dan memiliki ukuran yang kecil 26 mm (Hilje & Aide, 2012).

Ada hal yang mempengaruhi tingkat reproduksi dari *Diasporus diastema* yaitu suhu yang tinggi. Hal ini berdasarkan penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa pada spesies yang berkabit dekat dengan *Diasporus diastema* menunjukkan suhu yang lebih tinggi dapat mempercepat perkembangan embrio telur, akan tetapi juga dapat memperlambat penetasan jika suhu ekstrim (>24°C) (Batista et al, 2016). *Diasporus diastema* bertelur di habitat arboreal dan berkembang langsung menjadi katak kecil tanpa tahap menjadi larva (Rivera and brian, 2018).

METODE

Bahan dan Alat

Seperangkat komputer dengan *software* gratis atau *freeware* untuk desain primer yaitu *software PerlPrimer* v1.1.21 untuk *Microsoft Windows* 3.2Mb koneksi internet ke database NCBI (*online*).

Desain Primer

Untuk mendesain primer, dilakukan dengan menggunakan *software PerlPrimer* v1.1.21 untuk *Microsoft Windows* 3.2Mb dengan cara mengunduh fasta pada gen COI *Diasporus diastema* dari *GenBank*: KT186586 yang dipilih pada database NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*), setelah itu memasukkan *sequence* berupa fasta yang telah diunduh. Selanjutnya, klik *find inwards*, lalu beberapa kandidat pasangan primer akan muncul pada halaman *software* tersebut. Setelah itu, dilakukan analisis untuk memilih kandidat pasangan primer yang terbaik dan memenuhi kriteria desain primer. Untuk memenuhi kriteria desain primer, hal-hal yang harus diperhatikan adalah panjang primer harus 18-22 mer, T_m dengan besar 52°C sampai 59°C, Gc 40% sampai 60%. Pada *repeats*, primer tidak berulang lebih dari 2 basa dan maksimal 4 kali. Pada *runs*, tidak diulangi sebanyak lebih dari 4 kali pengulangan, dan pada *amplicon length*, idealnya panjang PCR produk adalah sebanyak 100 sampai 500 basa.

Pembandingan *PerlPrimer*

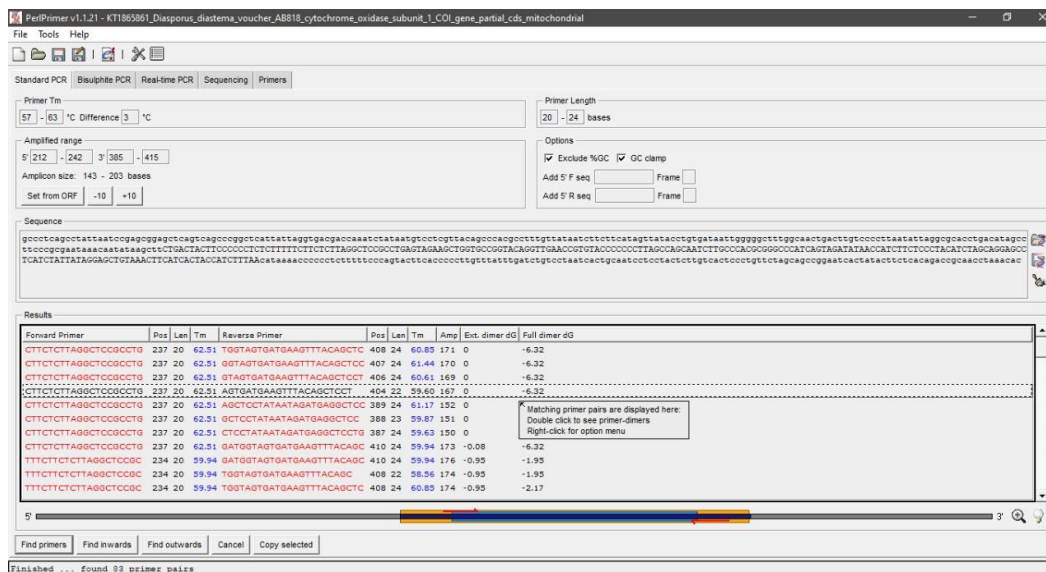
Untuk pembandingan desain primer yang dilakukan di *software PerlPrimer* v1.1.21, akan dilakukan di database NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*) yang terletak pada fitur *Primer-BLAST*. Tahap yang pertama kali dilakukan adalah menyalin *sequens* DNA pada fasta gen COI dari *GenBank*: KT186586, setelah itu mengklik bagian *figure Primer-BLAST* dari NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Kemudian masukkan *sequens* DNA ke dalam kolom fasta yang disediakan. Selanjutnya, klik *get primes* pada bagian pojok kiri bawah lalu akan menunjukkan proses *sequencing* pada DNA. Di bawahnya terdapat hasil *details primer report* menunjukkan urutan basa nitrogen yang akan digunakan sebagai primer dari *sekuens* DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan teknologi daring, berikut adalah hasil yang menunjukkan desain primer dengan menggunakan *software PerlPrimer* yang dibandingkan dengan fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI.

Penggunaan *software PerlPrimer* untuk Desain Primer

Berdasarkan hasil penyeleksian kandidat primer gen Sitokrom-C Oksidase Subunit-I (COI) *Diasporus Diastema* pada *software PerlPrimer*, data kandidat primer yang diseleksi disajikan pada Gambar 1.

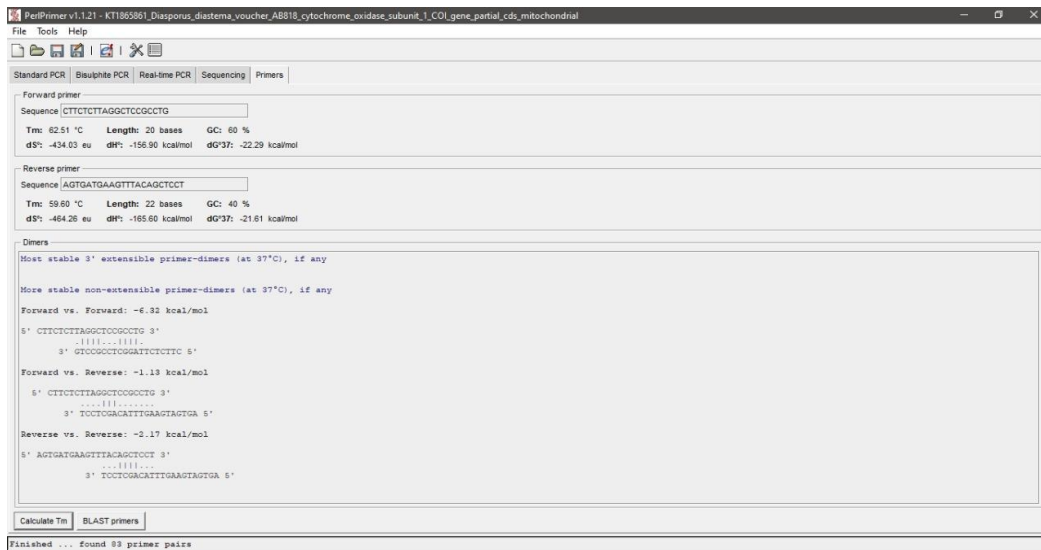


Gambar 1. Kandidat Primer untuk gen COI *Diasporus Diastema* menggunakan software PerlPrimer

Penggunaan software PerlPrimer bertujuan untuk perhitungan suhu leleh (T_m) yang setelah itu ditentukan suhu *annealing* awal agar produk PCR yang optimal dapat dihasilkan (Agustiniingsih dkk., 2016). Pada hasil penelitian desain primer menggunakan Software PerlPrimer dihasilkan tujuh kandidat dengan ext. dimer dG 0 (gambar 1), beberapa kandidat primer kemudian diseleksi untuk mendapatkan hasil terbaik. Pemilihan kandidat tersebut dipilih yang paling memenuhi kriteria (Prezioso, 2006; Pahlevi; 2016). Pemilihan primer yang baik adalah dengan menentukan primer yang spesifik. Jika primer tersebut tidak spesifik, maka daerah lain yang ada dalam genom yang tidak dijadikan sasaran akan teramplifikasi dan bisa juga daerah genom tidak ada yang teramplifikasi.

Cara menentukan kandidat primer yang terbaik dengan memperhatikan hal-hal sebagai berikut, diantaranya ikatan ujung 3',

temperature melting (T_m), panjang primer, serta kandungan GC (Saraswati dkk., 2019). *Self 3' complementary* juga harus diperhatikan dalam pemilihan primer. Sebaiknya, *self 3' complementary* memiliki nilai rendah karena akan menyebabkan tidak terikatan pasangan primer dengan dirinya sendiri dan juga struktur hairpin dapat terbentuk (Safitri dkk., 2018). Penting bagi desain primer agar primer *dimer* dan primer *hairpin* diminimalkan (Pahlevi, 2016). Dimer merupakan pembentukan struktur antara primer yang menyatu karena basisnya saling melengkapi. Pada saat suhu rendah, biasanya terjadi suhu penempelan yang sesuai pada proses tersebut. Sedangkan suhu *annealing* yang optimal, dapat menyebabkan menempelnya primer pada DNA cetakan yang bersamaan dengan proses pembentukan dimer (Saraswati dkk., 2019). Pada Gambar 2 adalah kandidat primer yang akan dipilih paling memenuhi kriteria pemilihan primer.



Gambar 2. Rekomendasi Sekuens Primer Gen COI *Diasporus Diastema* Menggunakan *PerlPrimer*

Berdasarkan Gambar 2, dipilih satu pasangan primer yang paling memenuhi kriteria primer yaitu primer nomor 4. Primer tersebut dipilih karena memenuhi kriteria pemilihan primer terbaik dengan nilai Tm 59.60-62.51. Pasangan primer dengan nilai Tm selisih 5°C telah memenuhi syarat. Hal ini, seperti yang dikemukakan oleh Safira, dkk (2018) yaitu, pasangan primer yang memiliki selisih 5°C adalah primer yang baik agar pada proses amplifikasi tidak terjadi penurunan. Kemudian, pasangan primer tersebut memiliki nilai %GC sebesar 40%-60% yang artinya memenuhi syarat kriteria pasangan primer yang baik. Jika nilai %GC dibawah 40%, dapat mengakibatkan proses PCR akan menurunkan efisiensi. Hal ini disebabkan oleh ketidakmampuan primer dalam berkompetisi secara efektif untuk menempel pada *template*. Sedangkan primer dengan nilai %GC yang tinggi, mengakibatkan antara primer dengan DNA target membentuk ikatan yang terlalu kuat yang dapat menyebabkan rendahnya hasil produk PCR tetapi lebih spesifik (Pratiwi, 2015). Pentingnya memperhatikan %GC juga disebabkan karena pengaruh dari jumlah basa dari G dan C terhadap jumlah Tm (Saraswati dkk., 2019).

Selanjutnya, panjang primer adalah kriteria yang perlu diamati. Hasil penelitian panjang primer pada Gambar 2,

memperlihatkan *forward primer* : 5' CTTCTCTTAGGCTCCGCCTG 3' dan *reverse primer* : 5' AGTGATGAAGTTTACAGCTCCT 3' dengan panjang primer sebesar 20-22 bp. Hasil tersebut, telah memenuhi kriteria pasangan primer terbaik. Sesuai dengan yang disampaikan Safitri, dkk (2018). Panjang primer yang baik adalah dengan nilai 18-30 bp. Jika panjang primer memiliki nilai lebih dari 30 basa, maka dapat terjadi ketidak spesifikan pada primer tersebut. Sedangkan primer yang spesifik adalah panjang yang nilainya lebih dari 20 bp (Pahlevi, 2016). Selain itu, letak dari ikatan G-C pada ujung 3' juga penting untuk diamati. Hasil yang menunjukkan paling sedikitnya jumlah ikatan G-C adalah primer yang baik untuk dipilih agar struktur dimer dapat dihindari keberadaannya serta dapat terjadi gangguan pada proses amplifikasi (Saraswati dkk., 2019). Pada gambar 2, memperlihatkan hasil ikatan G-C pada ujung 3' dengan jumlah paling sedikit, yaitu 1 ikatan G-C.

Penggunaan Fitur *Primer-BLAST* Pada Situs NCBI Untuk Desain Primer

Berdasarkan hasil penyeleksian kandidat primer gen Sitokrom-C Oksidase Subunit-I (COI) *Diasporus Diastema* dengan fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI, data kandidat primer yang diseleksi disajikan pada Gambar 3.

Detailed primer reports

Primer pair 1

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	183	202	60.04	50.00	6.00	0.00
Reverse primer	Minus	20	256	237	60.03	55.00	5.00	0.00
Product length	74							

Primer pair 2

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	71	90	59.75	55.00	3.00	1.00
Reverse primer	Minus	20	202	183	60.04	50.00	6.00	3.00
Product length	132							

Primer pair 3

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	166	185	60.18	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	Minus	20	455	436	59.80	55.00	6.00	0.00
Product length	290							

Primer pair 4

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	436	455	59.80	55.00	6.00	0.00
Reverse primer	Minus	20	550	531	60.25	55.00	3.00	1.00
Product length	115							

Primer pair 5

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	172	191	60.46	60.00	3.00	0.00
Reverse primer	Minus	20	258	239	60.32	55.00	5.00	0.00
Product length	87							

Primer pair 6

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	244	263	59.74	55.00	5.00	1.00
Reverse primer	Minus	20	321	302	60.68	55.00	6.00	2.00
Product length	78							

Primer pair 7

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	435	454	59.80	55.00	6.00	0.00
Reverse primer	Minus	21	550	530	60.90	52.38	3.00	2.00
Product length	116							

Primer pair 8

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	252	271	60.46	60.00	4.00	0.00
Reverse primer	Minus	20	341	322	59.09	55.00	6.00	2.00
Product length	90							

Primer pair 9

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	20	243	262	59.33	60.00	7.00	2.00
Reverse primer	Minus	20	372	353	59.03	60.00	6.00	2.00
Product length	90							

Primer pair 10

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Plus	21	1	21	59.38	52.38	6.00	3.00
Reverse primer	Minus	20	90	71	59.75	55.00	3.00	2.00
Product length	90							

Gambar 3. Kandidat Primer untuk Gen COI *Diasporus Diastema* menggunakan Fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI

Pada penelitian ini, peneliti membandingkan hasil desain primer dengan yang menggunakan *software PerlPrimer* dan yang menggunakan fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI. Berdasarkan hasil desain primer dengan menggunakan menggunakan fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI (gambar 3), didapatkan 10 kandidat untuk dipilih pasangan primer yang paling memenuhi kriteria. Dari kesepuluh kandidat tersebut

(gambar 3), yang paling memenuhi kriteria adalah pasangan primer nomor 10. Hal tersebut dikarenakan nilai %GC pada pasangan primer nomor 10 adalah sebesar 52.38%-55.00% yang merupakan nilai ideal karena paling memenuhi kriteria pemilihan pasangan primer terbaik yaitu dengan nilai %GC sebesar 40% - 60%, sehingga nilai Tm mengikuti nilai ideal tersebut (Faisal & Pancoro, 2018).

Primer pair 10

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCCTCAGCCTATTAATCCGA	Plus	21	1	21	59.38	52.38	6.00	3.00
Reverse primer	GTGGGCTGTAACGAGGACAT	Minus	20	90	71	59.75	55.00	3.00	2.00
Product length	90								

Gambar 4. Rekomendasi Sekuens Primer untuk Gen COI *Diasporus Diastema* Menggunakan Fitur *Primer-BLAST* pada situs NCBI

Hasil dari desain primer pada pasangan primer nomor 10 tersebut (gambar 4) menunjukkan nilai Tm sebesar 59.38-59.75 dimana nilai tersebut memenuhi kriteria pemilihan pasangan primer terbaik yaitu memiliki nilai Tm yang selisihnya tidak lebih dari 5°C. Pada hasil

desain primer untuk panjang primer, gambar 4 tersebut menunjukkan *forward primer*: 5' GCCCTCAGCCTATTAATCCGA 3' dan *reverse primer*: 5' GTGGGCTGTAACGAGGACAT 3' dengan panjang primer sebesar 20-21 bp yang artinya ideal. Berdasarkan kriteria panjang

primer yang paling ideal adalah sebesar 18-30 bp (Pratiwi, 2015). Untuk pasangan G-C pada ujung 3', pada gambar 3, memperlihatkan hasil ikatan G-C pada ujung 3' dengan jumlah paling sedikit, yaitu 0 ikatan G-C, yang memenuhi kriteria pemilihan primer terbaik, yaitu ikatan G-C yang sebaiknya tidak melebihi 3 basa agar spesifitas primer tidak menurun. Primer yang memiliki 3 atau 3 lebih basa akan mengakibatkan *annealing* primer yang tidak spesifik menjadi stabil (Prakoso dkk., 2016).

Agar mendapatkan primer yang baik, pada *template* terdapat rangkaian basa nukleotida yang unik agar basa nukleotida tersebut tidak ada pada lokasi lain atau *sequence* yang terletak pada *template*. Dalam penggunaan desain primer dengan *Primer-BLAST* pada situs NCBI, dapat menghindari adanya *cross* homologi dimana primer yang unik serta tidak menempel pada organisme lain dapat dianalisis dengan *Primer-BLAST*, sehingga sangat dianjurkan untuk menggunakan situs desain primer dengan *Primer-BLAST* dibandingkan dengan *software PerlPrimer* (Sasmito, 2014). Pada *Primer-BLAST* data kandidat pasangan primer yang akan dipilih karena memenuhi kriteria terbaik secara langsung terbaca dalam satu halaman dengan keterangan Tm, GC, dan panjang primer yang akan dianalisis. *Primer-BLAST* juga dapat digunakan untuk melihat spesifitas primer, sedangkan *PerlPrimer* digunakan untuk melihat struktur sekunder (*hairpin loop* dan dimer) yang dihasilkan oleh primer (Tjampakasari, 2017). Menurut Weni (2020), untuk menentukan primer dengan karakteristik terbaik dapat dilakukan melalui *Primer-BLAST*, lalu analisis dilanjutkan menggunakan *PerlPrimer* untuk mengetahui stabilitas primer.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kondisi pandemi COVID-2019 dapat dilakukan kegiatan pembelajaran praktikum biologi molekular melalui teknologi daring, yaitu menggunakan *software PerlPrimer* dan fitur *Primer-BLAST* yang ada pada situs NCBI untuk melakukan desain primer. Hasil

pengujian tersebut menunjukkan bahwa fitur *Primer-BLAST* yang ada pada situs NCBI lebih direkomendasikan untuk mendapatkan desain primer terbaik dibandingkan dengan menggunakan *software PerlPrimer*. Hal tersebut dikarenakan hasil pembacaan pada *Primer-BLAST* langsung menunjukkan data Tm, presentase GC, hingga panjang primer sekaligus, serta dapat terhindar dari terjadinya *cross* homologi. Namun, untuk hasil yang lebih baik dapat digunakan pula kolaborasi dengan menggunakan keduanya, dimana *Primer-BLAST* digunakan untuk menentukan primer yang memiliki kriteria terbaik lalu dilanjutkan menganalisis stabilitas primer menggunakan *software PerlPrimer*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiningsih, A., Trimarsanto, H., Setiawaty, V., Artika, I. M., & Muljono, D. H. (2016). Primer development to obtain complete coding sequence of HA and NA genes of influenza A/H3N2 virus. *BMC research notes*, 9(1), 1-6.
- Batista, A., Gunther, K., Konrad, M., Andreas, H & M. Vesely. (2016). An integrative approach to reveal speciation and species richness in the genus *Diasporus* (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) in eastern Panama. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178: 267 311.
- Faisal, A. F., & Pancoro, A. (2018). Deteksi Dini *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction). *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(3), 267-275.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270 (SUPPL. 1), 1-5. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>

- Hilje, B & T. M. Aide. 2012. Calling activity of the common tink frog (*Diasporus diastema*) (*Eleutherodactylidae*) in secondary forests of the Caribbean of Costa Rica, *Tropical Conservation Science*, 5(1): 25-37.
- Mardhotillah, A. F., et al. (2020). Studi Eksplorasi Kegiatan Praktikum Sains Saat Pandemi Covid-19. *Indonesian Journal of Science Learning*, 1(2), 67-75.
- Pahlevi, M. R. (2018). Desain Primer untuk Identifikasi Gen GmDREB2 pada Kedelai. *JURNAL AGRONIS*, 1(1), 1-8.
- Prakoso, S. P., Wirajana, I. N., & Suarsa, I. W. (2016). Amplifikasi Fragmen Gen 18s rRNA pada DNA Metagenomik Madu dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*. 7, 1-7.
- Pratiwi, A. (2015). Optimasi Suhu Desain Primer Gen Blaz Resistensi pada Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *In Silico*. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1).
- Prezioso, V. R. (2006). General notes on primer design in PCR. BioSyst. Lab., Brinkmann Instrum. Inc., Westbury, NY, USA, Tech. Rep.
- Rivera, N & Brian F. 2018. Community assembly of glass frogs (*Centrolenidae*) in a Neotropical wet forest: a test of the river zonation hypothesis. *Journal of Tropical Ecology*, 34, 108-120.
- Safitri, T. A., Patty, D. N., & Saraswati, H. (2018). Gen L1 HPV 16 dan 18 sebagai Dasar dalam Desain Primer untuk Deteksi Kanker Leher Rahim dengan in-House Multiplex PCR. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(2), 67-71.
- Saraswati, H., Seprianto, S., & 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): 33-38.
- Saraswati, N. L. P. A., & Mertayasa, I. N. E. (2020). Pembelajaran Praktikum Kimia pada Masa Pandemi Covid-19: Qualitative Content Analysis Kecenderungan Pemanfaatan Teknologi Daring. *Wahana Matematika dan Sains: Jurnal Matematika, Sains, dan Pembelajarannya*, 14(2), 144-161.
- Sasmito, D. E. K., Rahadian, K., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNMed)*, 1(5), 93-102.
- Suryanti, E., Fitriani, A., Redjeki, S., & Riandi, R. (2019). Persepsi Mahasiswa terhadap Penggunaan Virtual Laboratory dalam Pembelajaran Biologi Molekuler. *Journal of Natural Science and Integration*, 2(2), 153-162.
- Tjampakasari, C. R. 2017. Dihydropteroate Synthase (DHPS) Terhadap Efektifitas Terapi *Pneumocystis*. *IJOB*. 1(1): 5-13.
- Weni, L. 2020. Analisis Bioinformatika Gen Cat (*Homo sapiens*): Penyandi Enzim Antioksidan Katalase dan Mutasi C330T pada Diabetes Melitus Tipe 1. *Majalah Sainstekes*. 7(2): 67-76.