

Optimasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan Identifikasi Ikan Hiu Muda (*Juvenile*) dengan Metode DNA *Barcoding*

Hanifa Laila Zaetuna ^a, Made Pharmawati ^{a*}, Andrianus Sembiring ^b

^a Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jalan Raya Kampus Bukit, Jimbaran, Badung, Bali-Indonesia

^b Biodiversitas Indonesia (BIONESIA), Jl. Cokroaminoto Gg Bina Kasuari, blok B. No 8 Ubung Kaja, Denpasar, Bali-Indonesia

*Email: made_pharmawati@unud.ac.id

Diterima (received) 11 Januari 2024; disetujui (accepted) 30 Agustus 2024; tersedia secara online (available online) 7 September 2024

Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) is a technique for in-vitro DNA synthesis and amplification used for the identification of animals, plants, and microorganisms through DNA barcoding. Molecular identification using PCR-based methods needs to be performed on juvenile sharks because key identifying characteristics at the species level are not yet visible, making morphology-based identification very challenging. Moreover, such conditions also do not support shark conservation, as sharks in this phase have not yet had the opportunity to reproduce once in their lifecycle. This study aims to determine the optimal conditions for DNA amplification and identify juvenile sharks using DNA Barcoding methods. Amplification is carried out at the cytochrome oxidase subunit I (COI) locus with temperature modifications during the annealing stage. The research results show that amplification modifications can be achieved by adjusting the annealing temperature. The best PCR product was obtained using 55°C annealing temperature. The identification of juvenile sharks landed at Muncar Coastal Fisheries Port using DNA Barcoding and the COI gene indicates *Prionace glauca* as the species.

Keywords: DNA amplification; DNA barcoding, juvenile shark, PCR optimization

Abstrak

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in-vitro* yang digunakan untuk identifikasi hewan, tumbuhan maupun mikroorganisme dengan DNA *barcoding*. Identifikasi secara molekular menggunakan metode berbasis PCR perlu dilakukan pada ikan hiu muda (*juvenile*) karena belum terlihatnya karakter kunci untuk identifikasi ke tingkat spesies sehingga identifikasi berbasis morfologi sangat sulit dilakukan. Selain itu, kondisi demikian juga tidak mendukung kelestarian ikan hiu, karena dalam fase ini hiu belum memiliki kesempatan memijah sekali dalam siklus hidupnya. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimal untuk amplifikasi DNA dan mengidentifikasi ikan hiu muda (*juvenile*) menggunakan metode DNA Barcoding. Amplifikasi dilakukan pada lokus *cytochrome oxidase* subunit I (COI) dengan modifikasi suhu pada tahap *annealing*. Hasil penelitian menunjukkan modifikasi amplifikasi dapat dilakukan dengan penggantian temperatur suhu *annealing*. Hasil PCR terbaik diperoleh pada suhu *annealing* 55°C. Hasil identifikasi ikan hiu muda (*juvenile*) yang didaratkan di Pelabuhan Perikanan Pantai (PPP) Muncar dengan metode DNA Barcoding pada gen COI adalah *Prionace glauca*.

Kata Kunci: amplifikasi DNA; DNA barcoding, ikan hiu muda (*juvenile*), optimasi PCR

1. Pendahuluan

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in-vitro* menggunakan mesin *thermocycler* yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) serta terjadi

doi: <https://doi.org/10.24843/blje.2024.v24.i02.p01>



© 2023 by the authors; Content from this work may be used under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 licence. Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI. Published under licence by Udayana University, Indonesia.

duplikasi jumlah target DNA untai ganda pada setiap siklusnya (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Metode berbasis PCR memiliki banyak kegunaan, misalnya deteksi keragaman genetik (Agustina *et al.*, 2021), analisis struktur populasi (Putra *et al.*, 2018) serta identifikasi hewan, tumbuhan maupun mikroorganisme dengan DNA *barcoding* (Yang *et al.*, 2018). DNA *barcoding* merupakan salah satu metode pendekatan molekuler yang dapat digunakan untuk pengenalan atau identifikasi spesies, khususnya objek berupa potongan organ suatu individu, seperti sirip hiu (Ward *et al.*, 2009). Pada hewan, metode ini dilakukan menggunakan gen *Cytochrome oxidase* subunit I (*COI*) yaitu urutan pendek segmen DNA yang ada di mitokondria sebagai dasar analisis identifikasi spesies (Hebert *et al.*, 2003).

Hiu merupakan predator puncak yang menjadi bagian penting dari ekosistem laut yang sehat karena berperan dalam menjaga keseimbangan ekosistem (Arrum *et al.*, 2016). Secara biologis, hiu memiliki tingkat pertumbuhan yang rendah seiring dengan kematangan seksual yang lambat, periode kehamilan yang relatif lama, dan fekunditas yang rendah dari tiap siklus reproduksinya. Faktor biologis tersebut mengakibatkan hiu sangat rentan terhadap tekanan aktivitas perikanan (Bräutigam *et al.*, 2015). Aktivitas penangkapan sumberdaya perikanan yang bersifat eksploitatif saat ini semakin pesat, salah satu hewan yang sangat rentan terhadap tingginya aktivitas penangkapan berlebih yaitu hiu. Tingginya permintaan pasar untuk sirip hiu, menjadikan angka perburuan hiu semakin meningkat. Di ekosistem laut, hiu sebagai predator teratas dalam rantai makanan berperan untuk mengontrol berbagai populasi hewan laut dalam rantai makanan (Bramasta *et al.*, 2021).

Pelabuhan Perikanan Pantai (PPP) Muncar terletak di ujung timur Pulau Jawa, tepatnya di Desa Kedungrejo, Kecamatan Muncar, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur. Kegiatan sehari-hari di PPP Muncar dipenuhi oleh aktivitas manusia yang memasarkan hasil lautnya (Chari & Lestari, 2019). Berdasarkan hasil sampling di pelabuhan muncar, didapatkan seekor ikan hiu muda (*juvenile*) yang perlu diidentifikasi nama spesiesnya. Dalam kondisi seperti ini, identifikasi berbasis morfologi akan sangat sulit dilakukan bahkan oleh ahli taksonomi terlatih karena karakter kunci untuk identifikasi ke tingkat spesies kurang terlihat. Oleh karena itu, metode berbasis DNA, khususnya DNA *barcode* perlu dilakukan. Selain itu, kondisi demikian tidak mendukung bagi kelestarian ikan hiu, karena dalam fase ini hiu belum memiliki kesempatan memijah sekali dalam siklus hidupnya (Chodrijah *et al.*, 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimal untuk amplifikasi DNA dalam hal ini menentukan suhu *annealing* terbaik dan mengidentifikasi ikan hiu muda menggunakan metode DNA *Barcoding* dengan sekuens gen *COI*.

2. Metode Penelitian

2.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel hiu dilakukan di Pelabuhan Perikanan Pantai (PPP) Muncar, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur. Pengambilan sampel diawali dengan pemberian identitas (ID) lapangan pada plastik yang diletakkan di samping sampel dan selanjutnya akan diambil gambar untuk dokumentasi seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan hiu muda yang di daratkan di Pelabuhan Muncar

Ikan hiu dipotong kurang lebih sepanjang 4 cm dan disimpan dalam plastik kemudian sampel dibawa ke laboratorium. Sampel dalam plastik kemudian akan dipindahkan ke tabung mikro yang sudah berisi etanol 96% untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA dan analisis molekuler.

2.2. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan larutan chelex 10% (Walsh *et al.*, 1991). Jaringan sampel diambil sebanyak ± 2 mm dengan menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 0,5 mL yang berisi larutan chelex. Sebelum dan sesudah mengambil jaringan, pinset dicelupkan ke dalam aquadest dan dipanaskan di *infrared sterilizer*. Kemudian, tabung mikro yang sudah berisi jaringan sampel dan larutan chelex, divortex selama ± 20 detik dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 60 detik. Tahap selanjutnya yaitu, tabung mikro dipanaskan dalam *heating block* dengan suhu 95°C selama ± 45 menit dan setiap 20 menit tabung mikro kembali divortex selama ± 20 detik dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 60 detik yang kemudian tabung mikro disimpan di dalam *refrigerator*. DNA siap digunakan untuk proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

2.3. Amplifikasi DNA

DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi pada lokus *cytochrome oxidase I* (COI) mitokondria. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer forward Fish F1 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3', dan reverse Fish R1 5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' (Ward *et al.*, 2005). Proses PCR dilakukan sebanyak 38 siklus dan setiap siklus terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi awal pada suhu 95°C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 50-55°C selama 15 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 10 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Campuran bahan yang digunakan adalah 13,5 μ L ddH₂O, 2,5 μ L 10 X PCR buffer (PE-II), 2,5 μ L dNTPs, 2 μ L MgCl₂, 1,25 μ L primer *forward*, 1,25 μ L primer *reverse*, 0,125 μ L PE amplitaq, dan 2 μ L DNA.

2.4. Visualisasi DNA

Hasil amplifikasi PCR selanjutnya analisis menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dan divisualisasikan menggunakan penyinaran *blue view transilluminator*. Proses elektroforesis dilakukan pada bak elektroforesis yang di dalamnya sudah berisi SB Buffer (*Boric Acid*) dan terhubung dengan *power supply* dengan tegangan listrik sebesar 120 volts, 200 mAmps selama 30 menit.

Ke dalam sumur gel dimasukkan 1 μ L 10x loading dye yang berfungsi sebagai pemberat, 3 μ L produk PCR dan 2 μ L larutan pewarna *ethidium bromide* (Etbr). Marker DNA untuk penentuan ukuran yang digunakan adalah *low DNA mass ladder* dengan panjang berkisar antara 100 - 2000 bp, yang dimasukkan ke sumur gel sebanyak 3 μ L.

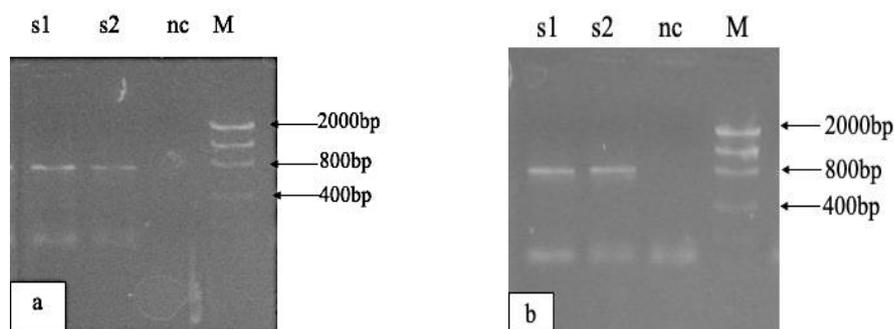
2.5. Analisis Data

Data hasil sekuensing berupa urutan basa nukleotida diedit menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis X* (MEGA 10). Data hasil sekuensing diselaraskan dengan menggunakan Clustal W untuk menentukan apakah hasil urutan homolog dengan urutan lain (Kumar *et al.*, 2016). Sekuen yang sudah melalui proses editing kemudian bisa diidentifikasi menggunakan fitur BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan Genbank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Pohon filogenetik dibuat menggunakan program MEGA, dengan metode *Neighbour-Joining Tree* untuk menguji hubungan antar taksa; menggunakan nilai bootstrap 1000. Model substitusi yang digunakan yaitu parameter kimura 2 (K2P) untuk mengukur perbedaan sekuens nukleotida pada analisis tingkat spesies, ketika jarak antar spesies dekat (Hebert *et al.*, 2003).

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil visualisasi produk PCR dengan suhu annealing 50°C, menghasilkan pita DNA yang memiliki pendaran yang kurang terang serta terdapat sedikit DNA yang mengoles (*smear*) dan adanya *primer dimer* di bagian bawah (Gambar 2a). Gambar 2b menunjukkan hasil PCR menggunakan suhu annealing 55°C. Pita DNA produk PCR tampak lebih tebal dan terang. Semakin jelas pita terbentuk, menunjukkan bahwa suhu annealing yang digunakan sudah sesuai untuk primer yang digunakan. Produk PCR yang dihasilkan berukuran 800 bp. Umumnya suhu optimal dari *annealing* adalah 5°C lebih rendah dari *melting temperature* (Tm) primer (Noflindawati *et al.*, 2021). *Melting temperature* dari primer Fish F1 dan Fish R1 adalah 76°C. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat mengurangi hasil PCR karena primer tidak menempel dengan baik. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi mencegah pengikatan primer yang optimal ke *template* DNA (Lorenz, 2012). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan suhu annealing 50°C dan 55°C.



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR dengan dua suhu annealing yang berbeda. (a) suhu *annealing* 50°C dan (b) suhu *annealing* 55°C. s1=ulangan 1, s2=ulangan 2, nc=kontrol negatif tanpa DNA *template*, M=DNA *size marker*

Modifikasi pada temperatur *annealing* adalah salah satu cara yang umum dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan dalam amplifikasi (Pertiwi *et al.*, 2015). Pada tahap *annealing* diperlukan suhu yang optimal karena pada tahapan ini primer akan menempel pada untai DNA cetakan yang sudah terbuka. Keberhasilan penempelan primer sangat mempengaruhi keberhasilan amplifikasi (Sambrook & Russell, 2001). Proses *annealing* memerlukan suhu yang tepat. Apabila terlalu rendah akan menyebabkan primer menempel pada sisi lain (tidak seharusnya) dan mengakibatkan DNA yang teramplifikasi memiliki spesifitas yang rendah. Sebaliknya, apabila suhu terlalu tinggi, primer tidak akan menempel sama sekali sehingga dapat menyebabkan gagalnya amplifikasi. Maka dari itu, mencari suhu optimum untuk proses *annealing* adalah salah satu proses yang penting untuk memperoleh DNA hasil pada daerah yang ditargetkan dengan jumlah yang maksimum, sehingga analisis DNA dapat dilakukan dengan mudah (Rahmadhan, 2019).

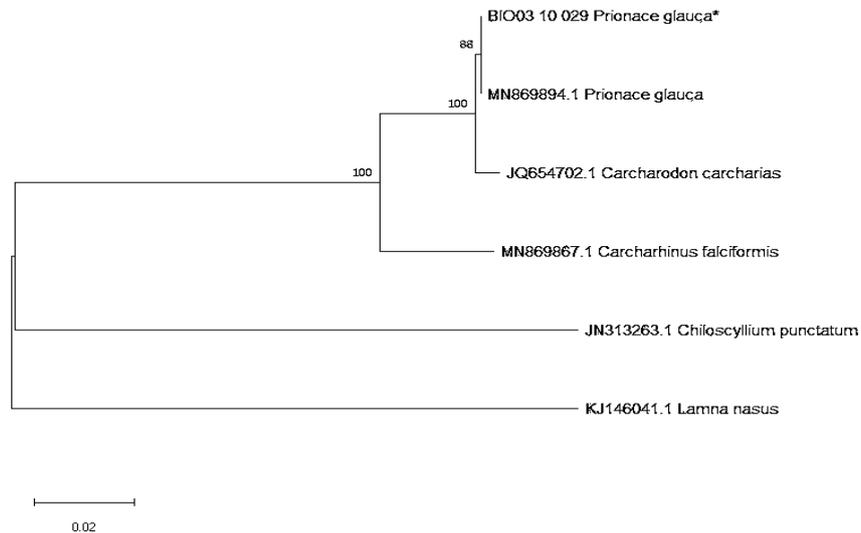
Hasil sekuensing sampel dianalisis menggunakan program MEGA X. Panjang sekuens gen COI yang diperoleh setelah dilakukan *editing* untuk dilakukan BLAST adalah 679 bp. Sekuen yang sudah melalui proses *editing* kemudian diidentifikasi menggunakan fitur BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yaitu suatu program untuk pencarian kemiripan sekuens (*sequence similarity*) dan merupakan alat dalam identifikasi gen dan karakter genetik. BLAST dapat melakukan pencarian sekuens melalui perbandingan dengan database DNA. Salah satu bank data yang bisa digunakan adalah NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Hubu *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil BLAST (Tabel 1) sampel memiliki nilai *identity* 100% dan *query cover* 98% artinya sekuens DNA sampel memiliki panjang sekuens yang sama dengan database genbank 98-100% dengan E-value 0.0. Berdasarkan nilai yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa sekuens sampel memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan sekuens pada Genbank. Hal ini sama yang dikemukakan Prehadi *et al.* (2014) bahwa tingkat homologi 99-100% dapat dikatakan spesies yang identik dan dapat diidentifikasi sebagai spesies tersebut dan kurang dari 95% tingkat

homologinya rendah. Selain itu menurut Hartono *et al.* (2021), *E-value* yang bernilai 0 (nol) menunjukkan bahwa kedua sekuens tersebut identik.

Tabel 1. Hasil BLAST pada sistem NCBI

ID	Analisis BLAST	GenBank accession	Score	Identity (%)	Query Cover (%)	E-Value
BIO03.10.029	<i>Prionace glauca</i>	MN869894.1	1242	100	98	0.0

Analisis filogenetik dilakukan adalah untuk menyusun hubungan kekerabatan yang pada umumnya digambarkan dalam suatu garis yang bercabang-cabang seperti pohon yang disebut pohon filogenetik (Subari *et al.*, 2021). Pohon filogenetik menunjukkan sekuen mengelompok berdasarkan kelas, ordo dan famili yang berbeda. Konstruksi tersebut menampilkan pengelompokan spesies terjadi berdasarkan kesamaan genetik yang berkaitan dengan hubungan kekerabatan (Simbolon & Aji, 2021).



Gambar 3. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining Tree* dengan kimura – 2 parameter dari sampel ikan hiu muda (*juvenile*) dan sampel yang didapatkan dari Genbank. *= sampel ikan hiu muda (*juvenile*)

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik sampel ikan hiu muda dengan penanda COI dan samoel yang didapatkan di Genbank (Gambar 3). membentuk lima cabang (*clade*) yang berbeda, cabang pertama hingga ketiga merupakan cabang *ingroup* dan cabang keempat dan kelima merupakan cabang *outgroup*.

Ikan-ikan yang berada pada *ingroup* termasuk kedalam satu famili yang sama dan terbagi kedalam tiga genus yang berbeda dengan nilai bootstrap sebesar 88 – 100%. Nilai *bootstrap* merupakan nilai yang menyatakan peluang terjadinya perubahan susunan cabang (*clade*) pada pohon filogenetik. Semakin tinggi nilai bootstrap menunjukkan semakin kecil terjadinya perubahan susunan antar cabang (*clade*) sehingga pohon yang dibentuk akan konsisten dan tidak berubah (Hall, 2001). Menurut Lemey *et al.* (2009) untuk melakukan analisis *Neigbor Joining Tree* dan mendapatkan data yang relatif stabil dibutuhkan nilai bootstrap lebih besar dari 70. Dalam pohon filogenetik digunakan spesies *outgroup* yaitu *Chiloscyllium punctatum* yang tergolong dalam famili Hemiscylliidae dan *Lamna nasus* yang tergolong dalam famili

Lamnidae yang sekuen nukleotidanya berasal dari Genbank untuk memberikan jarak dalam analisis filogenetik. Pemilihan outgroup dalam proses rooting berasal dari taksa yang berada di luar *ingruop*, tetapi masih memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *ingroup* (Rahayu & Jannah, 2019).

4. Simpulan

Modifikasi amplifikasi dapat dilakukan dengan penggantian suhu *annealing*. Hasil identifikasi ikan hiu muda (*juvenile*) yang didaratkan di Pelabuhan Perikanan Pantai (PPP) Muncar dengan metode DNA barcoding pada gen COI adalah *Prionace glauca*.

Ucapan terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Biodiversitas Indonesia (BIONESIA) yang telah mendanai penelitian ini serta atas segala fasilitas dan laboratorium dalam penelitian ini. Selain itu, terima kasih juga kepada serta semua pihak yang telah membantu penelitian ini

Daftar Pustaka

- Agustina, M., Setyadji, B., Pharmawati, M., & Junitha, I. K. (2022). Genetic Diversity and Population Structure of Bullet Tuna (*Auxis rochei*) from Bali and Its Adjacent Waters. *HAYATI Journal of Biosciences*, **29**(4), 507-514.
- Arrum, S. P., Ghofar, A., & Rejeki, S. (2016). Komposisi Jenis Hiu dan Distribusi Titik Penangkapannya di Perairan Pesisir Cilacap, Jawa Tengah. *Diponegoro Journal of Maquares*, **5**(4), 242 – 248.
- Bramasta, R. C., Faiqoh, E., Hendrawan, I. G., Sembiring, A., & Yusmalinda, N. L. A. (2021). Identifikasi Hiu yang Diperdagangkan di Bali Menggunakan Metode DNA Barcoding dan Analisis Filogenetik. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*, **7**(1), 84-93.
- Bräutigam, A., Callow, M., Campbell, I. R., Camhi, M. D., Cornish, A. S., Dulvy, N. K., Fordham, S. V., Fowler, S. L., Hood, A. R., McClellan, C., Reuter, E. L., Sant, G. Simpfendorfer, C. A., & Welch, D. J. (2015). *39 Global Priorities for Conserving Sharks and Rays: A 2015–2025 Strategy*.
- Chari, N. A., & Lestari, N. D. (2019). Silky Shark Trust: Strategi Pengelolaan Konservasi Hiu Kejen (*Carcharhinus falciformis*) di ppp muncar, banyuwangi. *Prosiding pusat riset perikanan*, **1**(1), 293-300.
- Chodriyah, U., Jatmiko, I., & Sentosa, A. A. (2018). Parameter Populasi Hiu Kejen (*Carcharhinus falciformis*) di Perairan Selatan Nusa Tenggara Barat. *BAWAL Widya Riset Perikanan Tangkap*. **9**(3), 175-183.
- Hall, J. P., & Harvey, D. J. (2001). A Phylogenetic Analysis of the Neotropical Riodinid Butterfly Genera Juditha, Lemonias, Thisbe and Uraneis, with a Revision of Juditha (Lepidoptera: Riodinidae: Nymphidiini). *Systematic Entomology*, **26**(4), 453-490.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction. *Unitas*, **9**(1), 17-29.
- Hartono, D. A., Setyorini, S., & Karimah, S. A. (2021). Model Komputasi BLAST Pada Lingkungan Hadoop. *eProceedings of Engineering*, **8**(1), 908-917.
- Subari, A., Razak, A., & Sumarmin, R. (2021). Phylogenetic Analysis of Rasbora spp. Based on the Mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*, **21**(1), 89-94.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**(1512), 313-321.
- Hubu, H. S., Wullur, S., Warouw, V., Ginting, E. L., Bara, R. A., & Wantasen, A. S. (2021). Filogeni Molekuler Bakteri Dari Media Pemeliharaan Rotifer Yang Diberi Olahan Limbah Ikan Sebagai Sumber Nutrisi. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, **9**(1): 38-44.
- Kumar, V. P., Shrivastwa, A., Nigam, P., Kumar, D., & Goyal, S. P. 2016. Genetic Characterization of Wild Swamp Deer Populations: Ex-Situ Conservation and Forensics Implications. *Mitochondrial DNA Part A*, **28**(6): 965- 970.
-

- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A. M. (2009). *The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **63**, e3998.
- Noflindawati, Anwar, A., Sutanto, A., & Yusniwati (2021). Optimization of Annealing Cycle and Temperature SNAP T12 Primer Distinguishing Markers for Male, Female and Hermaphrodite Plants in Papaya (*Carica papaya* L). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **715**(1), 012040. IOP Publishing.
- Pertiwi, N. P. D., Mahardika, I. G. N. K., & Watiniasih, N. L. (2015). Optimasi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (polymerase chain reaction) pada ikan karang anggota famili Pseudochromidae (Dottyback) untuk identifikasi spesies secara molekular. *Jurnal Biologi*, **19**(2), 1-5.
- Prehadi, P., Sembiring, A., Kurniasih, E. M., Rahmad, R., Arafat, D., Subhan, B., and Madduppa, H. H. (2015). DNA Barcoding and Phylogenetic Reconstruction of Shark Species Landed in Muncar Fisheries Landing Site in Comparison with Southern Java Fishing Port. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **16**(1).
- Putra, I. N. G., Syamsuni, Y. F., Subhan, B., Pharmawati, M., & Madduppa, H. (2018). Strong genetic differentiation in tropical seagrass *Enhalus acoroides* (Hydrocharitaceae) at the Indo-Malay Archipelago revealed by microsatellite DNA. *PeerJ*, **6**, e4315.
- Rahayu, D. A., & Jannah, M. (2019). *DNA Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Jakarta, Indonesia: Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.
- Rahmadhan, D., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Pengaruh Suhu Annealing Terhadap Amplifikasi Gen Tem Menggunakan Primer Dengan % GC Rendah. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, **4**(1), 1-7.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Simbolon, A. R., & Aji, L. P. (2021). Identifikasi Molekular dan Struktur Filogenetik Moluska (Gastropoda dan Bivalvia) di Perairan Biak, Papua. *Bawal Widya Riset Perikanan Tangkap*, **13**(1), 11-21.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*, **10**(2), 506-513.
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The Campaign to DNA Barcode All Fishes. *Journal of Fish Biology*, **74**(2), 329-356.
- Ward, T., Faivre, M., Abkarian, M., & Stone, H. A. (2005). Microfluidic flow focusing: Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis*, **26**(19), 3716-3724.
- Yang, F., Ding, F., Chen, H., He, M., Zhu, S., Ma, X., ... & Li, H. (2018). DNA barcoding for the identification and authentication of animal species in traditional medicine. *Hindawi-Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2018**(1), 1-18.