

Studi Molekuler dan Filogenetik Ascidian Kolonial Asal Perairan Pulau Tidung dan Pulau Pari

Julia Lestari Arumsari¹, Diah Ayuningrum^{2*}, Aninditia Sabdaningsih²

¹Program Studi S1 Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

²Departemen Sumber Daya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof Jacub Rais, Tembalang, Semarang, 50275 Indonesia
Email: diahayuningrum21@lecturer.undip.ac.id

Abstrak

Ascidian merupakan biota bentik yang hidup menempel pada ekosistem terumbu karang. Permasalahan terbatasnya informasi tentang jenis ascidian di Kepulauan Seribu serta minimnya eksplorasi ascidian menjadikan penelitian tentang identifikasi ascidian penting untuk dilakukan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui spesies ascidian kolonial dan kekerabatan antar spesies yang ditemukan di ekosistem terumbu karang Pulau Tidung dan Pulau Pari berdasarkan metode deskriptif eksploratif. Hasil penelitian menunjukkan lima spesies ascidian kolonial yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari dua famili yang berbeda yaitu satu jenis *Leptoclinides* sp. dan tiga jenis *Didemnum* sp. yang berasal dari Famili Didemnidae; satu jenis *Aplidium* sp. yang berasal dari Famili Polyclinidae. Berdasarkan proses identifikasi molekuler melalui proses optimasi volume DNA *template* dan suhu *annealing*, hanya satu dari lima sampel yang berhasil diamplifikasi menggunakan dua pasang primer yang berbeda. Sampel tersebut berkode PT02-02 (B) yang berasal dari Pulau Tidung dan diamplifikasi menggunakan primer *Did forward* dan primer *Did reverse*. Hasil identifikasi spesies ascidian kolonial sampel PT02-02(B) memiliki *query length* sebesar 597 bp. Hasil BLAST pada *website* NCBI menunjukkan sampel PT02-02 (B) memiliki kemiripan dengan spesies *Aplidium* sp. dengan nilai *Query Cover* 98% dan *Per. Ident* 80,31%. Hasil filogenetik spesies *Aplidium* sp. dengan *Aplidium accarensense* yang ditemukan di Laut Mediterania Timur menunjukkan nilai *bootstrap* sebesar 90%.

Kata kunci : Ascidian kolonial, DNA *barcoding*, Filogenetik, Molekuler, PCR

Abstract

Molecular and Phylogenetic Study of Colonial Ascidians from the Waters of Tidung Island and Pari Island

*Ascidians are benthic organisms that live attached to coral reef ecosystems. The limited information available on ascidian species in the Thousand Islands and the lack of ascidian exploration make research on ascidian identification important to conduct. The objective of this study is to identify colonial ascidian species and their phylogenetic relationships found in the coral reef ecosystems of Tidung Island and Pari Island using an exploratory descriptive method. The results of the study showed that the five colonial ascidian species used in this study belonged to two different families: one species of *Leptoclinides* sp. and three species of *Didemnum* sp. from the *Didemnidae* family; and one species of *Aplidium* sp. from the *Polyclinidae* family. Based on molecular identification through optimization of DNA template volume and annealing temperature, only one of the five samples was successfully amplified using two pairs of different primers. The sample, coded PT02-02 (B), originated from Tidung Island and was amplified using the *Did forward* primer and *Did reverse* primer. The species identification results for the colonial ascidian sample PT02-02(B) had a query length of 597 bp. BLAST results on the NCBI website showed that sample PT02-02 (B) was similar to the species *Aplidium* sp. with a *Query Cover* value of 98% and *Per. Ident* 80.31%. The phylogenetic results of *Aplidium* sp. with *Aplidium accarensense* found in the Eastern Mediterranean Sea showed a bootstrap value of 90%.*

Keywords : Colonial ascidian, DNA *barcoding*, Molecular, PCR, Phylogenetics

*Corresponding author

DOI:10.14710/buloma.v15i1.76536

<http://ejournal.undip.ac.id/index.php/buloma>

Diterima/Received : 29-07-2025

Disetujui/Accepted : 29-01-2026

PENDAHULUAN

Kepulauan Seribu, DKI Jakarta, merupakan gugusan pulau yang berada di utara Teluk Jakarta. Wilayah ini memiliki 110 pulau dengan luas perairan sebesar 8.700 km² (Fauzanabri *et al.*, 2021). Luasnya wilayah perairan menjadikan Kepulauan Seribu sebagai salah satu kawasan perairan penting di Indonesia, terutama dalam konteks ekosistem laut. Pada tahun 2002, Kepulauan Seribu ditetapkan menjadi Taman Nasional melalui Keputusan Menteri Kehutanan Nomor SK. 6310/Kpts-II 2002 dengan luas 107.489 Ha. Kawasan Kepulauan Seribu memiliki *biodiversity* atau keanekaragaman hayati yang tinggi untuk beberapa spesies lautnya (Fauzan dan Burhanuddin, 2023). Ekosistem terumbu karang merupakan ekosistem yang tumbuh subur di Kepulauan Seribu, khususnya di Pulau Tidung Kecil. Luasan terumbu karang hidup di Pulau Tidung mencakup 253,14 ha (Darmawan *et al.*, 2025). Selain itu, ekosistem terumbu karang juga dapat ditemukan di Pulau Pari dengan luasan tutupan terumbu karang 193,78 ha (Leonard *et al.*, 2020). Ekosistem terumbu karang menjadi salah satu ekosistem yang cukup produktif dalam perairan, baik sebagai *feeding ground*, *nursery ground*, ataupun *spawning ground* (Handayani dan Dewi, 2023). Ekosistem ini menjadi tempat hidup bagi beragam makhluk hidup yang ada di Kepulauan Seribu. Salah satu biota yang cukup sering ditemukan menempel pada terumbu karang adalah Ascidian atau dikenal dengan Tunikata (Piri *et al.*, 2022).

Ascidian, makroalga, dan *sponge* merupakan organisme benthik yang hidup pada ekosistem terumbu karang (Coppock *et al.*, 2024). Ascidian (*sea squirt*) adalah Urochordata laut yang hidup secara menetap atau melekat dalam bentuk koloni atau soliter (Ayuningrum *et al.*, 2019). Ascidian terbagi menjadi tiga kelas, yaitu kelas Appendicularia, kelas Thaliacea, dan kelas Ascidiacea. Kelas Ascidiacea (disebut juga Ascidian) (disebut juga Ascidian) merupakan kelas yang memiliki anggota paling banyak. Kelas ini terbagi menjadi tiga ordo, yaitu Aplousobranchia, Phlebobranchia, dan Stolidobranchia (Gallo *et al.*, 2024). Spesies dari ordo Aplousobranchia beranggotakan kebanyakan sebagai ascidian kolonial, sedangkan spesies dari ordo Phlebobranchia dan Stolidobranchia mencakup spesies kolonial dan soliter. Ordo Aplousobranchia merupakan kelompok ascidian yang memiliki jumlah spesies terbanyak (Krasovec *et al.*, 2021).

Terumbu karang dan ascidian memiliki hubungan timbal balik satu sama lain. Terumbu karang menyediakan substrat yang keras dan stabil bagi ascidian untuk menempel dan tumbuh (Angkouw *et al.*, 2023). Terumbu karang menyediakan makanan dan habitat bagi ascidian untuk berlindung dari berbagai macam predator dan kompetitor. Interaksi antara ascidian dengan organisme lain ini dapat memengaruhi distribusi dan kelimpahannya. Ascidian merupakan hewan *filter feeder* yang menyaring makanan dari air laut (Jacobi *et al.*, 2018). Aktivitas tersebut membantu menjaga kualitas air di sekitar terumbu karang. Tetapi keberadaan ascidian yang berlebih pada terumbu karang memiliki pengaruh yang negatif karena ascidian merupakan kompetitor ruang yang kuat bagi terumbu karang (Roth *et al.*, 2018). Selain itu, ascidian yang melimpah akan menimbulkan risiko bagi kesehatan karang (Eckhardt *et al.*, 2024).

Permasalahan terbatasnya informasi tentang jenis ascidian di Kepulauan Seribu serta minimnya eksplorasi ascidian menjadikan penelitian tentang identifikasi ascidian penting untuk dilakukan. Identifikasi spesies ascidian kolonial yang hidup di ekosistem terumbu karang penting dilakukan sebagai sumber referensi dalam penelitian bioteknologi dan melalui identifikasi dapat menggambarkan karakteristik spesies mengingat ascidian kolonial merupakan salah satu spesies yang memiliki peran ekologis di perairan. Di perairan, spesies tersebut berperan terhadap kestabilan ekosistem laut, bagian dari rantai makanan, mangsa bagi hewan laut, serta digunakan sebagai bioindikator untuk menilai kualitas perairan (Palit *et al.*, 2022), sedangkan dalam bidang farmakologi, senyawa bioaktif yang dihasilkan ascidian berfungsi sebagai antikanker, antiinflamasi, dan antimikroba (Mujipradhana *et al.*, 2018). Beberapa spesies ascidian kolonial merupakan spesies kriptik (*cryptic species*) (Viard *et al.*, 2019). Morfologi ascidian sedikit mirip *sponge* jika dilihat didalam air. Meskipun demikian, tunikata dapat dibedakan dari *sponge* dilihat dari keberadaan *branchial siphon* dan *atrial siphon* (Ayuningrum *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil penelitian terdahulu di India, bahwa ascidian kolonial, khususnya Famili Didemnidae termasuk yang sulit dibedakan secara morfologi karena ukuran *zooid* yang kecil, sehingga memerlukan identifikasi berdasarkan karakter molekuler (Senthamarai *et al.*, 2018). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi karakter molekuler

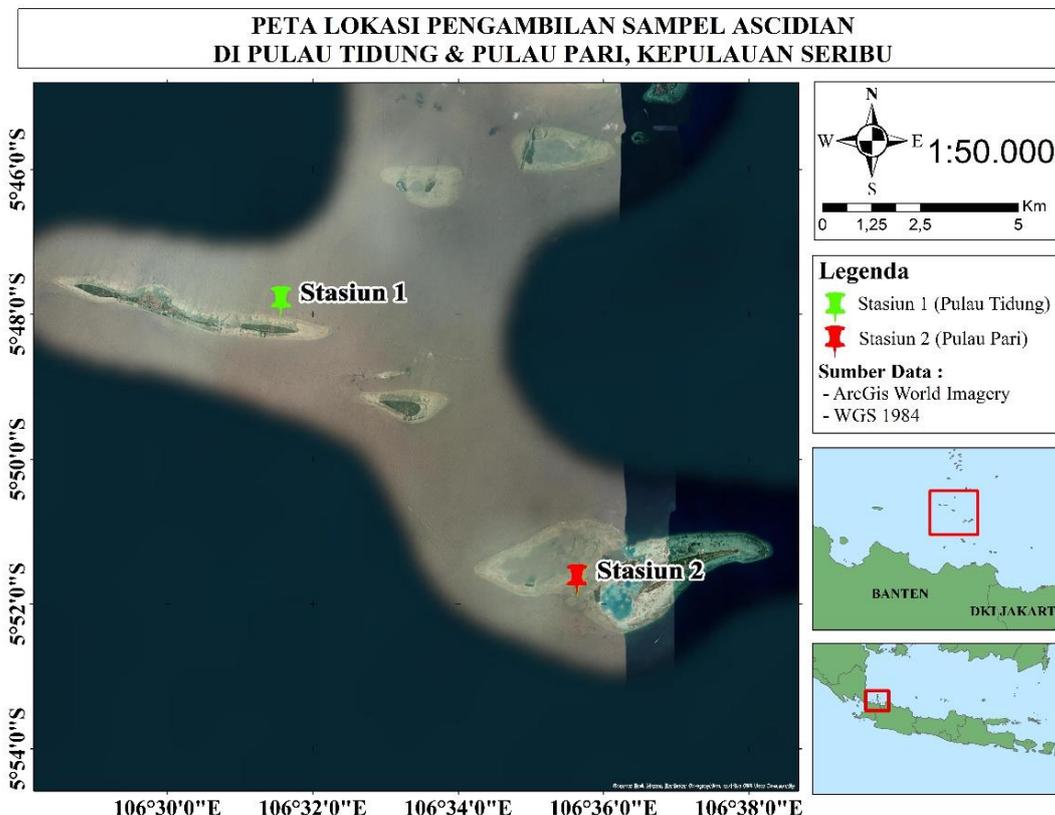
ascidian melalui pendekatan DNA *barcoding*. Pendataan DNA *barcoding* bermanfaat untuk memvalidasi spesies ascidian yang telah diidentifikasi secara morfologi serta kekerabatannya melalui analisis filogenetik. Pengetahuan tentang hubungan kekerabatan suatu spesies diperlukan untuk mempelajari evolusi beberapa taksa yang memiliki kekerabatan dengan membandingkan sekuen DNA-nya (Pangsuma dan Hidayat., 2023).

MATERI DAN METODE

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode deskriptif eksploratif. Metode deskriptif eksploratif yaitu suatu metode penelitian yang dilakukan dengan tujuan utama untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena. Metode ini digunakan untuk mencari dan mendeskripsikan informasi terkait spesies ascidian kolonial yang ditemukan di Pulau Tidung dan Pulau Pari, Kepulauan Seribu. Data kuantitatif dalam penelitian ini berupa data numerik hasil identifikasi molekuler yang didukung dengan adanya angka kemiripan dengan GenBank (Puspitasari *et al.*,

2025). Pengambilan sampel ini dilaksanakan pada dua stasiun Kepulauan Seribu, yaitu Pulau Tidung dan Pulau Pari (Gambar 1).

Pengambilan sampel ascidian dilakukan dengan penyelaman pada titik lokasi 05°48’01.56”S dan 106°31’33.64”E untuk stasiun 1 dengan kode PT01/02 Pulau Tidung dan 05°51’51.83”S dan 106°35’38.64”E untuk stasiun 2 dengan kode PR01 Pulau Pari. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil seluruh bagian dari ascidian menggunakan scraper kemudian dimasukkan ke dalam ziplock. Langkah kerja preservasi sampel dimulai dengan mengambil satu spesimen utuh untuk ascidian soliter atau sepotong koloni untuk ascidian kolonial. Spesimen kemudian dibius menggunakan mentol selama kurang lebih 2 jam. Setelah 2 jam, sampel kemudian dibilas menggunakan air laut steril agar terpisah dari materi pengotor yang menempel. Sampel yang telah bersih kemudian difiksasi ke dalam tabung falcon berukuran 50 ml yang berisi formalin-air laut 4% untuk identifikasi morfologi dan alkohol 96% untuk identifikasi molekuler (Ali dan Khan, 2019).



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel ascidian di Kepulauan Seribu

Proses ekstraksi sampel ascidian menggunakan TIANamp Genomic DNA Kit dan *chelex* 10%. Proses ekstraksi DNA dari sampel ascidian dapat dilakukan melalui dua metode utama.

Metode pertama menggunakan kit komersial, dimulai dengan memasukkan sampel ascidian utuh berukuran 3–5 cm, termasuk tunik dan zooidnya, ke dalam microtube, kemudian disentrifuge pada 10.000 rpm selama 1 menit, diikuti dengan pembuangan supernatant dan penambahan 200 µl Buffer GA pada pellet. Selanjutnya, 20 µl Proteinase K ditambahkan dan diinkubasi pada 56°C selama 1 jam, lalu 200 µl Buffer GB ditambahkan, dihomogenkan, dan diinkubasi pada 70°C selama 10 menit sebelum disentrifuge kembali. Setelah itu, 20 µl ethanol 96% ditambahkan, divortex selama 15 detik hingga terbentuk endapan putih, dan sampel dipindahkan ke tabung CB3 untuk serangkaian pencucian dengan Buffer GD (500 µl) dan Buffer PW (600 µl) melalui sentrifugasi pada 12.000 rpm. Akhirnya, tabung CB3 disentrifuge pada 12.000 rpm selama 2 menit, diletakkan pada microtube baru, ditambahkan 200 µl Buffer TE langsung ke membran, diinkubasi pada suhu ruang selama 2-5 menit, dan disentrifuge selama 2 menit pada 12.000 rpm.

Metode kedua menggunakan Chelex 10%, dimulai dengan menghaluskan 30 mg sampel ascidian utuh menggunakan micropestle, menambahkan 300 µl DDH₂O, lalu mengambil 200 µl cairan sampel dan memasukkannya ke microtube baru yang berisi 200 µl Chelex 10%. Larutan divortex selama 20 detik, disentrifuge pada 13.000 rpm selama 20 detik, diinkubasi pada 95°C selama 45 menit, divortex lagi, dan disentrifuge selama 2 menit. Supernatant yang dihasilkan kemudian dipindahkan ke microtube baru dan disimpan di freezer pada -20°C.

Kedua metode ini dirancang untuk mengisolasi DNA secara efektif dari ascidian, dengan metode kit lebih kompleks dan melibatkan beberapa buffer spesifik, sedangkan metode

Chelex lebih sederhana namun tetap menghasilkan ekstrak DNA yang dapat disimpan untuk analisis selanjutnya.

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) membutuhkan komponen yang disebut primer. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Set primer yang digunakan, yaitu Tun *Forward-Reverse* (Stefaniak *et al.*, 2009) dan primer Did *Forward-Reverse* (Oliveira *et al.*, 2017). Sampel yang akan diamplifikasi terdiri dari campuran antara *red taq polymerase* (12,5 µl), primer Tun *Forward* (1 µl), primer Tun *Reverse* (1 µl), DNA *template* (2 µl), serta DDH₂O (8,5 µl).

Berikut adalah kondisi siklus untuk COI menggunakan primer Tun F dan Tun R (Stefaniak *et al.*, 2009), denaturasi awal selama 1 menit pada suhu 94°C, diikuti oleh 60 siklus denaturasi 10 detik pada suhu 94°C, *annealing* 30 detik pada suhu 50°C, dan elongasi 50 detik pada suhu 72°C, dengan elongasi akhir selama 10 menit pada suhu 72°C. Sementara kondisi siklus untuk primer Tun R dan Tun F (Oliveira *et al.*, 2017) yaitu denaturasi awal selama 4 menit pada suhu 95 °C, diikuti oleh 1 menit pada suhu 94 °C, 1 menit pada suhu 39 °C, dan 1,5 menit pada suhu 72 °C selama 40 siklus, dengan ekstensi akhir selama 10 menit pada suhu 72 °C. Terakhir, kondisi siklus untuk COI menggunakan primer Did F dan Did R adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 2,5 menit pada suhu 95 °C, diikuti oleh 40 detik pada suhu 94 °C, 40 detik pada suhu 44 °C, dan 1 menit pada suhu 72 °C selama 40 siklus, dengan ekstensi akhir selama 10 menit pada suhu 72 °C. Urutan basa dari pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1).

DNA yang telah diamplifikasi selanjutnya akan dielektroforesis secara horizontal menggunakan *gel agarose* 1% dengan tegangan 70 volt selama 50 menit. DNA yang sudah terelektroforesis selanjutnya divisualisasikan menggunakan UV Transilluminator (Ayuningrum *et al.*, 2025).

Tabel 1. Primer untuk Amplifikasi dan Sekuensing Gen COI

<i>Markers</i>	<i>Primers</i>	<i>References</i>
CO1	TunF– 5'TCGACTAATCATAAAGATATTAG3' TunR– 5'AACTTGTATTTAAATTACGATC3'	(Stefaniak <i>et al.</i> , 2009)
CO1	DidF–5'TATCIACIAATCATAAAGATATTGG3' DidR–5'CTTCTYCYGRWGGRTCAAAAARCT3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2017)

Analisa Data

Hasil sekuens nukleotida berupa kromatogram selanjutnya dianalisis menggunakan metode Sanger *sequencing* dan *software* MEGA XI (Kumar *et al.*, 2018). Proses pensejajaran nukleotida dari hasil sekuensing pasangan primer *forward* dan *reverse*. Hasil pensejajaran nukleotida tersebut kemudian diubah kedalam bentuk file fasta untuk digunakan dalam proses pencocokan sekuens DNA dengan database spesies yang ada di situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Proses pencocokan sekuens tersebut dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang tersedia di situs NCBI (Hebert and Megléc, 2022). Hasil BLAST yang diunduh dalam format FASTA nantinya akan dijadikan sebagai sekuens acuan dalam mengkonstruksi posisi filogenik menggunakan metode *neighbor joining tree* 1000 *bootstrap* dengan model Tamura-Nei

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA sampel ascidian dengan kode PR01-03, PT01-02, PT01-04, PT01-10, dan PT02-02 dilakukan menggunakan *Thermo Scientific Nanodrop 2000/2000c Spectrofotometers*. Hasil uji konsentrasi dan kemurnian DNA disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Hasil ekstraksi yang baik memiliki kemurnian 1,8–2,0 ng/μl (Perwitasari *et al.*, 2020). Kemurnian DNA diukur berdasarkan penyerapan

cahaya UV. DNA akan menyerap sinar UV pada panjang gelombang 260 nm sedangkan kontaminannya seperti protein akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm, sehingga kemurnian DNA dilihat dari perbandingan nilai absorbansi gelombang 260 nm dengan gelombang 280 nm (Alaboodi *et al.*, 2025). Hasil ekstraksi dari lima sampel ascidian memiliki nilai konsentrasi dan kemurnian yang bervariasi. Lima sampel ascidian yang diekstraksi dengan dua metode yang berbeda, ekstraksi sampel ascidian menggunakan TIANamp Genomic Kit DNA memiliki nilai kemurnian berkisar 2,53–11,91 ng/μl dengan konsentrasi DNA <10 ng/μl, sedangkan sampel yang diekstraksi menggunakan *chelex* 10% memiliki nilai kemurnian berkisar 1,17–1,86 ng/μl dengan konsentrasi DNA >10 ng/μl. Hal tersebut menunjukkan bahwa dua sampel yang diekstraksi menggunakan *chelex* 10% memiliki nilai kemurnian dan konsentrasi yang baik. Nilai kemurnian DNA kurang dari 1,8 diindikasikan terkontaminasi oleh protein, sedangkan nilai kemurnian DNA lebih dari 2,0 terkontaminasi RNA (Nugroho *et al.*, 2016).

Konsentrasi DNA yang tinggi pada cetakan DNA yang digunakan pada amplifikasi dapat mengganggu proses amplifikasi, sedangkan jika konsentrasi DNA terlalu rendah, peluang penempelan primer pada cetakan DNA menjadi kecil sehingga amplifikasi tidak normal (Kusuma, 2022). Hasil pengujian nilai konsentrasi DNA ascidian menggunakan *Thermo Scientific Nanodrop 2000/2000c* diketahui memiliki rentang

Tabel 2. Hasil Uji Konsentrasi dan Kemurnian Ekstraksi DNA Menggunakan TIANamp Genomic DNA Kit

Kode Sampel	Konsentrasi Asam Nukleat (ng/μl)	A260 (ng/μl)	A280 (ng/μl)	260/280 (ng/μl)
PR01-03	4,9	0,097	0,038	2,53
PT01-02	5,8	0,116	0,031	3,72
PT01-04	3,4	0,068	0,006	11,91
PT01-10	8,0	0,160	0,054	2,97
PT02-02	4,5	0,089	0,024	3,74

Tabel 3. Hasil Uji Konsentrasi dan Kemurnian DNA Menggunakan *Chelex* 10%

Kode Sampel	Konsentrasi Asam Nukleat (ng/μl)	A260 (ng/μl)	A280 (ng/μl)	260/280 (ng/μl)
PR01-03	142,3	2,846	1,558	1,83
PT01-02	16,5	0,331	0,178	1,86
PT01-04	41,0	0,820	0,494	1,66
PT01-10	150,0	3,000	1,896	1,58
PT02-02	60,8	1,217	1,039	1,17

nilai 3,4–8,0 ng/μl untuk sampel hasil ekstraksi dengan DNA Kit (Tabel 2) Sementara sampel ascidian yang diekstraksi menggunakan *chelex* 10% memiliki besaran konsentrasi berkisar 16,5–150,0 ng/μl. Berdasarkan hasil pengujian nilai konsentrasi DNA, dapat diketahui bahwa konsentrasi sampel yang diekstraksi dengan metode *chelex* 10% memiliki nilai konsentrasi yang lebih baik. Hasil ekstraksi DNA dianggap baik jika nilai kemurnian berada dalam rentang 1,8–2,0 dan konsentrasinya lebih dari 20 (ng/μL) (Sophian *et al.*, 2021).

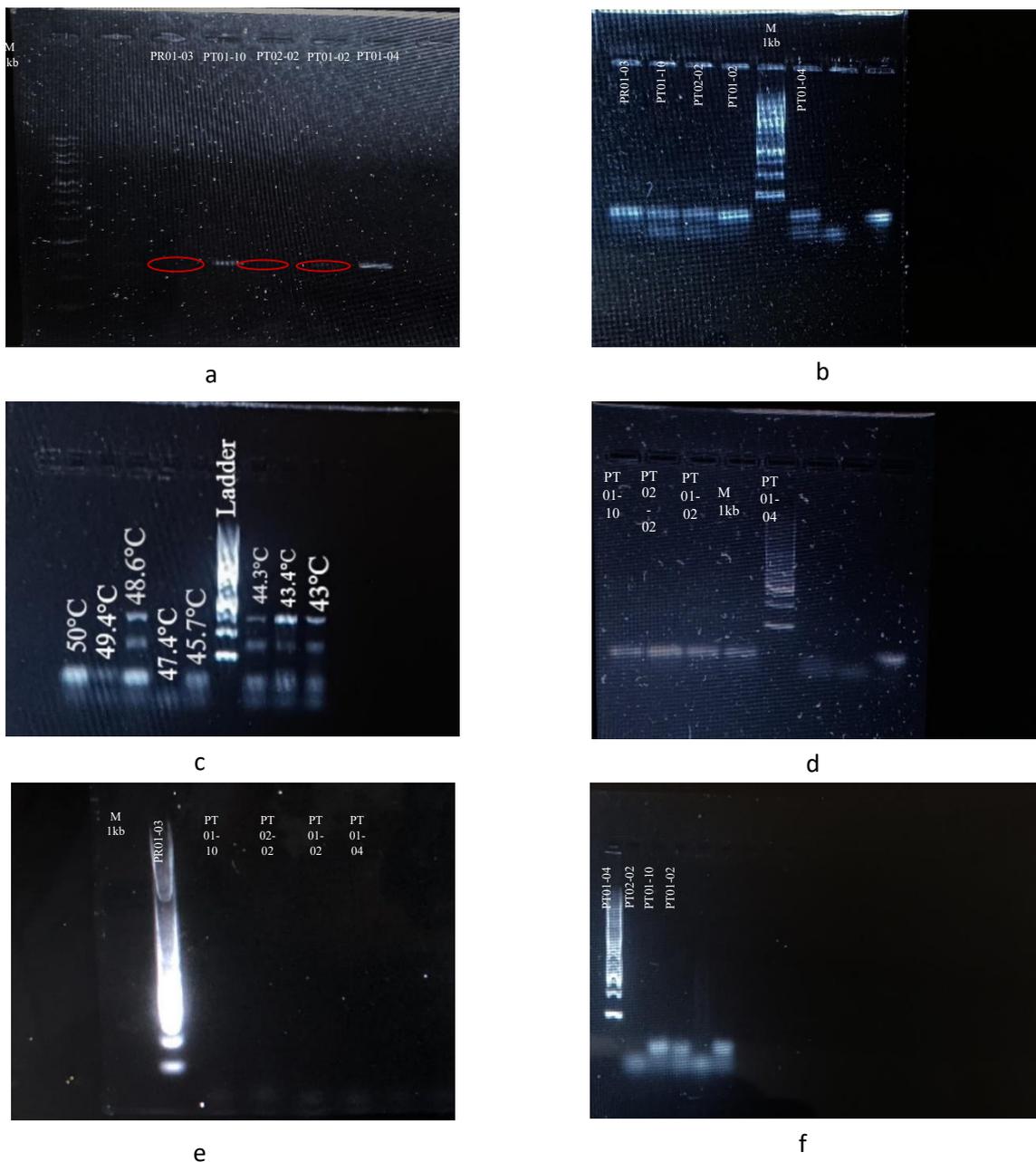
Terdapat beberapa metode ekstraksi DNA yang umum digunakan, diantaranya yaitu metode *chelex* dan metode kit ekstraksi DNA. *Chelex* mengikat ion magnesium (Mg^{2+}) agar molekul DNA tidak terdegradasi, sedangkan metode kit DNA mengikat DNA secara spesifik menggunakan membran silika (Singh *et al.*, 2018). Ekstraksi menggunakan metode *chelex* lebih cepat dan sederhana dengan tahapan yang lebih singkat dibandingkan dengan metode kit DNA yang sedikit lebih kompleks karena melibatkan beberapa pencucian. Metode *chelex* cenderung menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi dibandingkan kit DNA. Meskipun konsentrasi DNA yang lebih tinggi terdeteksi menggunakan metode *Chelex-100*, metode *Chelex-100* merupakan metode ekstraksi DNA yang lebih kasar, yang mengakibatkan masuknya banyak kontaminan dalam produk yang diekstraksi. Metode kit komersial mengekstrak DNA pada konsentrasi yang lebih rendah, tetapi beberapa langkah ekstraksi menghasilkan kemurnian DNA yang lebih tinggi (Yang *et al.*, 2024). Adapun isolasi DNA menggunakan kit komersial lebih aman dari kesalahan pengerjaan yang menimbulkan kontaminasi, namun penelitian pada beberapa spesimen dengan berbagai perlakuan menyatakan tidak semua kit komersial mampu memanen DNA dalam konsentrasi tinggi (Suadi *et al.*, 2020). Hal ini dikarenakan sebagian besar kit DNA komersial yang tersedia memerlukan beberapa langkah untuk memisahkan asam nukleat, yang menyebabkan seringnya pemindahan sampel dan potensi kontaminasi DNA. Hasil pengujian konsentrasi menunjukkan DNA hasil ekstraksi dengan metode *chelex* memiliki nilai konsentrasi 16,5–150,0 ng/μl, sedangkan nilai konsentrasi hasil ekstraksi kit DNA memiliki konsentrasi 3,4–8,0 ng/μl ng/μl. Nilai konsentrasi DNA *template* hasil ekstraksi kit DNA lebih rendah karena proses pemurnian yang ketat dan

tahap pencucian yang menghilangkan sebagian DNA (Menchhoff *et al.*, 2020).

Optimasi Volume DNA *Template*

Hasil optimasi konsentrasi *template* dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil optimum pada optimasi volume *template* dengan TiaGen Kit DNA diperoleh pada volume *template* 2 μl sedangkan konsentrasi *template* 1 μl dan 2 μl yang diekstraksi dengan *Chelex* 10% tidak terlihat pita sama sekali. Hasil optimasi volume DNA *template* dapat dilihat pada Gambar 2.

Untuk mendapatkan kondisi reaksi yang efektif dan spesifik dalam menghasilkan produk DNA target, diperlukan optimasi proses amplifikasi DNA. Proses optimasi amplifikasi DNA terbagi menjadi beberapa tahapan. Pertama optimasi dilakukan terhadap volume DNA *template* yang digunakan. Penentuan volume DNA *template* yang tepat dilakukan sebanyak enam kali percobaan, dimana keenam percobaan tersebut menggunakan DNA *template* yang diekstraksi menggunakan dua metode yang berbeda. Percobaan pertama yaitu menggunakan DNA *template* hasil ekstraksi TiaNamp Kit DNA dengan volume 0,5 μl. Hasil visualisasi menunjukkan pita terdeteksi di bawah *band* target (Gambar 2a), sehingga konsentrasi ditingkatkan menjadi 1 μl. Namun, pita DNA juga tidak terdeteksi pada konsentrasi tersebut, sehingga dilakukan percobaan gradien suhu terhadap satu sampel menggunakan DNA *template* sebanyak 2 μl. Hasil visualisasi menunjukkan pita DNA yang terlihat jelas dan tegas (Gambar 2c). Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan konsentrasi DNA hasil ekstraksi di dalam *template* yang digunakan untuk PCR serta perbedaan konsentrasi DNA yang berhasil diamplifikasi. Selanjutnya, kelima sampel diamplifikasi kembali dengan volume *template* 2 μl menggunakan suhu hasil gradien. Namun, hasil menunjukkan tidak ada pita DNA yang terbaca, sehingga dilakukan ekstraksi ulang menggunakan metode *Chelex* 10%. Proses PCR dilakukan dengan volume DNA *template* 1 dan 2 μl, namun hasil visualisasi menunjukkan pita DNA kelima sampel belum terlihat. Berdasarkan beberapa percobaan yang telah dilakukan, diketahui bahwa nilai konsentrasi ekstraksi yang rendah dapat dilakukan proses PCR. Hal ini sesuai dengan pernyataan Baraze *et al.*, (2025) yang menyatakan, sampel DNA yang diekstraksi dapat digunakan untuk uji PCR *real-time* jika nilai kemurnian dan konsentrasinya cukup baik. Meskipun konsentrasi



Gambar 2. Hasil Optimasi Volume DNA *Template*. a) Volume DNA *template* hasil ekstraksi DNA Kit 0,5µl, b) Volume DNA *template* hasil ekstraksi DNA Kit 1 µl, c) Volume DNA *template* hasil ekstraksi DNA Kit 2 µl, d) Volume DNA *template* hasil ekstraksi DNA Kit 2 µl, e) Volume DNA *template* 1 µl hasil ekstraksi *Chelex* 10%, dan f) Volume DNA *template* 2 µl hasil ekstraksi *Chelex*

DNA rendah, PCR *real-time* masih mungkin dilakukan asalkan alat PCR yang dipakai cukup sensitif untuk mendeteksi dan menggandakan DNA tersebut.

Optimasi Suhu *Annealing*

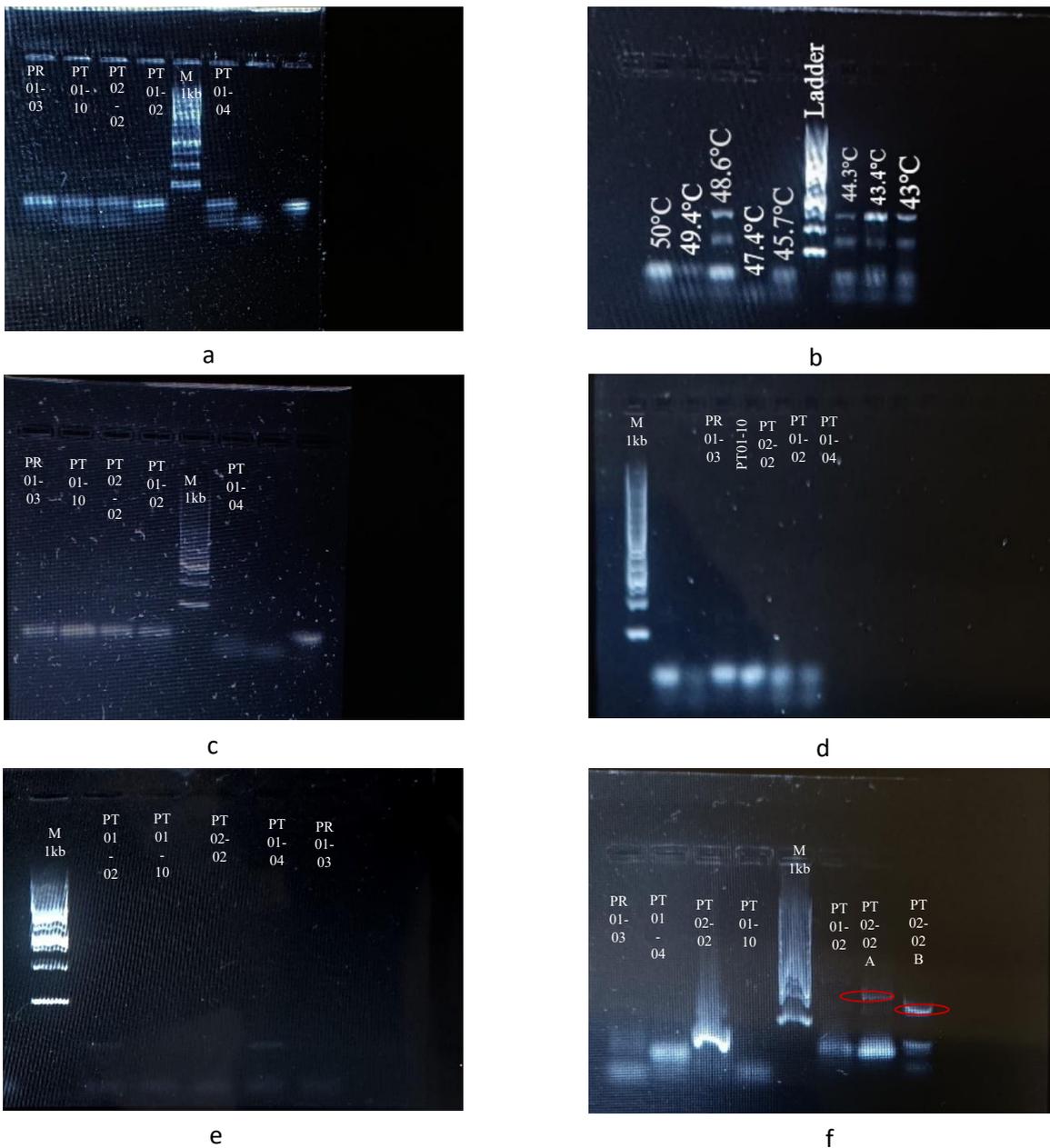
Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk mengetahui suhu *annealing* yang tepat untuk penempelan primer. Ketepatan suhu *annealing*

sangat berpengaruh terhadap spesifitas dan jumlah DNA yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan suhu *annealing* berperan penting dalam keberhasilan penempelan primer pada DNA *template*. Hasil optimasi suhu *annealing* dapat dilihat pada Gambar 3.

Optimasi kedua dilakukan terhadap suhu *annealing* saat proses amplifikasi DNA. Optimasi suhu *annealing* saat proses amplifikasi DNA dilakukan sebanyak enam kali percobaan dengan

jenis primer yang berbeda. Percobaan pertama sampai keempat menggunakan sepasang primer gen CO1 Tun *Forward* dan Tun *Reverse*, sementara percobaan kelima dan keenam menggunakan sepasang primer Did *Forward* dan Did *Reverse*. Primer Tun dan primer Did merupakan primer gen CO1 yang memiliki urutan basa nukleotida yang berbeda. Primer Tun memiliki urutan basa yang sudah pasti, sementara primer Did dalam penelitian ini merupakan formula primer baru yang dimodifikasi oleh

Oliveira *et al.*, 2017 dan memiliki urutan basa yang belum pasti. Hal ini ditunjukkan dengan adanya huruf R, Y, dan W pada sekuens primer. Huruf-huruf tersebut dalam nomenklatur IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) merepresentasikan urutan basa degenerasi, artinya huruf-huruf tersebut mewakili lebih dari satu nukleotida spesifik. Huruf R mewakili basa Adenin atau Guanin, huruf Y mewakili Sitosin atau Timin, dan huruf W mewakili Adenin atau Timin (Procházka dan Holub, 2019).

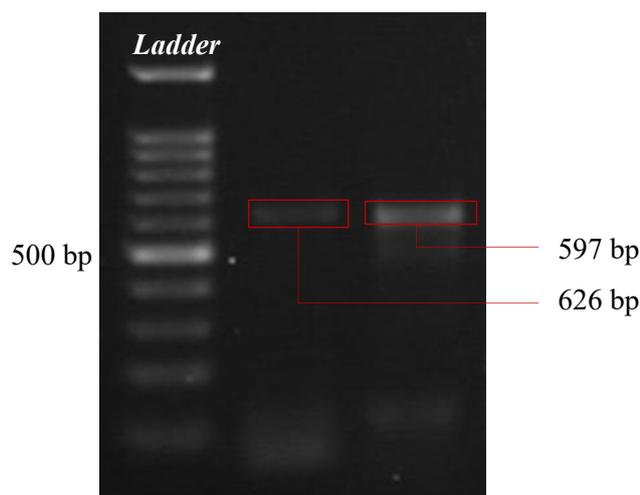


Gambar 3. Hasil Optimasi Suhu *Annealing*, a) Suhu *annealing* 50°C dan volume *template* 1 µl, b) Hasil optimasi suhu menggunakan gradien PCR dengan *template* 2 µl, c) Suhu *annealing* 43°C dan volume *template* 2 µl, d) Suhu *annealing* 39°C dan volume *template* 2 µl, e) Suhu *annealing* 44°C, f) Hasil *nested* sampel PCR dengan suhu *annealing* 44°C

Optimasi suhu *annealing* saat proses amplifikasi DNA dilakukan sebanyak enam kali percobaan dengan suhu *annealing* yang berbeda. Percobaan pertama menggunakan suhu 50°C dan pita DNA belum terbaca (Gambar 3a). Selanjutnya, percobaan kedua dilakukan gradien terhadap suhu PCR untuk menentukan suhu yang tepat dalam proses penempelan primer. Suhu *annealing* (*annealing temperature*) dioptimasi berdasarkan *temperature melting* (T_m) primer (Anggreni *et al.*, 2024). Optimasi suhu *annealing* dalam mendeteksi suatu gen target umumnya dilakukan pada kisaran $\pm 5^\circ\text{C}$ dari T_m (suhu melelehnya primer dalam proses amplifikasi) nya (Yuenleni, 2019). Proses gradien suhu *annealing* untuk proses amplifikasi diujikan pada salah satu sampel yakni PT02-02 dengan suhu yang berikisar 43–50°C. Berdasarkan, hasil elektroforesis yang divisualisasikan, pada suhu 43°C, 43.4°C, 44.3°C, dan 48.6°C pita DNA terlihat berpendar (Gambar 3b). Percobaan ketiga menggunakan suhu *annealing* 43°C dan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa suhu tersebut masih kurang optimal karena pita yang dihasilkan tidak terlihat. Percobaan keempat dilakukan menggunakan suhu *annealing* 39°C (Oliveira *et al.*, 2017). Hasil yang didapatkan juga masih kurang optimal karena pita tidak berpendar. Percobaan kelima menggunakan sepasang primer Did *Forward-Reverse* dengan suhu 44°C dan tidak diperoleh pita. Percobaan keenam menggunakan metode *nested*, yaitu mengamplifikasi ulang sampel hasil PCR percobaan kedua yang menggunakan sepasang primer Tun dengan

sepasang primer Did pada suhu 44°C. Pada percobaan ini, hanya sampel kode PT02-02(A) dan PT02-02(B) yang menghasilkan pita DNA cukup tipis meskipun masih berbayang (Gambar 3f). Metode *nested* menggunakan dua pasang primer, satu primer digunakan dalam reaksi PCR pertama, yang kemudian dilanjutkan dengan reaksi PCR kedua menggunakan produk PCR pertama dan dengan pasang primer kedua (Naully dan Sepriliyana, 2022). Hasil visualisasi sampel ascidian menggunakan alat UV Transilluminator disajikan pada Gambar 4.

Berdasarkan hasil *nested* PCR, sampel PR01-03, PT01-02, PT01-04, PT01-10, dan PT02-02 tidak muncul sama sekali, sehingga hanya sampel PT02-02(A) dan PT02-02(B) yang dikirim ke Genetika Science untuk dilakukan proses sekuensing. Sampel PR01-03, PT01-02, PT01-04, PT01-10 merupakan anggota Famili Didemnidae. Anggota famili ini terkenal sulit diidentifikasi karena *zooid-zooid* kecil *Didemnum* sp. tertanam dalam substrat tunik yang keras dan padat. Beberapa taksa ascidia dicirikan dengan adanya spikula mineral, salah satunya Famili Didemnidae. Sklerit ini sebagian besar terdapat di dalam tunik (Łukowiak *et al.*, 2016). *Zooid* Famili Didemnidae tertanam dalam tunik yang tebal (Järnegren *et al.*, 2023). Hal tersebut menjadi salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya konsentrasi DNA sampel karena proses lisis yang kurang sempurna. Konsentrasi DNA yang terlalu rendah mengakibatkan proses amplifikasi tidak berjalan optimal sehingga hasil visualisasi terlihat tipis



Gambar 4. Hasil Visualisasi Produk PCR Sampel Ascidian PT02 dengan Primer Tun *Forward* dan Tun *Reverse* (A) serta Sampel Ascidian PT02 dengan Primer Did *Forward* dan Did *Reverse* (B) yang menunjukkan panjang basa 626 bp dan 597 bp.

bahkan tidak terbaca. Hasil visualisasi produk PCR dari Genetika Science setelah elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA pada sampel yang berhasil diamplifikasi, namun kedua sampel tersebut menunjukkan ketebalan pita DNA yang berbeda (Gambar 4) Sampel PT02-02(A) merupakan hasil *nested* yang diamplifikasi ulang menggunakan sepasang primer Tun, sedangkan PT02-02(B) merupakan hasil *nested* yang diamplifikasi ulang menggunakan sepasang primer Did. Sampel PT02-02(B) memiliki pita DNA yang lebih tebal dibandingkan pita DNA sampel PT02-02(A), meskipun pita DNA sampel PT02-02(B) terlihat ganda. Ukuran pita yang terlalu tebal diduga akibat terjadinya penumpukan dengan pita lain pada ukuran ampikon yang berbeda dan tidak sesuai dengan ukuran DNA target, kondisi ini dinamakan dengan *mispriming* yang disebabkan oleh ketidaksesuaian kondisi primer (Anissa *et al.*, 2024). Primer mempunyai tingkat spesifitas tertentu pada DNA target (Kayama *et al.*, 2021).

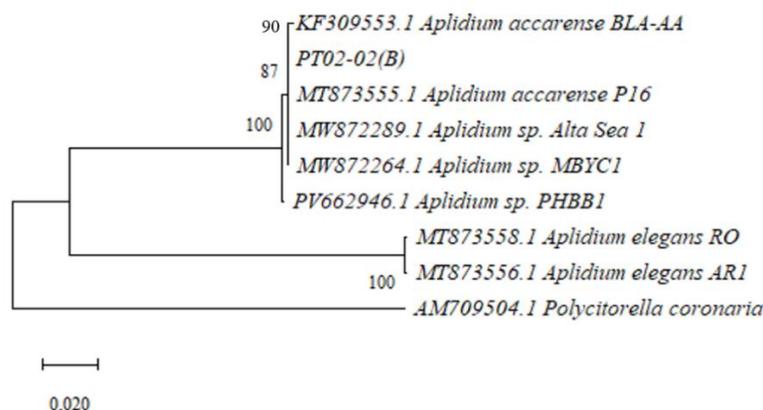
Proses analisis dilakukan dengan metode BLAST pada *website* NCBI, hasil BLAST menunjukkan sampel PT02-02(B) memiliki *query length* berkisar antara 597 bp dan *query cover* sebesar 98% dengan spesies *Aplidium*. Panjang band yang dihasilkan tersebut sesuai dengan band target untuk gen COI yaitu 500-600 bp. Fragmen gen COI ditandai dengan adanya band DNA di sumur gel dengan panjang antara ~700 pasangan basa (BP) (Zafeiropoulos *et al.*, 2021). Angka *Query Cover* pada hasil BLAST menandakan persentase panjang sekuens dengan suatu spesies yang ada di GenBank (Sihotang *et al.*, 2021). Nilai *Per. Ident* yang dihasilkan dari bank data NCBI sebesar 80,31%, dimana hasil sekuens

menunjukkan kedekatan hubungan kekerabatan pada spesies *Aplidium* sp. Hasil analisis BLAST berupa nilai similaritas yang ditunjukkan dengan nilai *identity*. Semakin tinggi nilai parameter ini menunjukkan semakin mirip urutan basa sampel dengan database (Ghasemi *et al.*, 2024).

Konstruksi Pohon Filogenetik

Data sekuensing hasil BLAST berupa penyelarasan basa nitrogen melalui *software* MEGA, selanjutnya diolah untuk konstruksi filogenetik. Kekerabatan *Aplidium* sp. dapat diketahui dengan melihat hasil konstruksi pohon filogenetik yang disajikan pada Gambar 5.

Penyusunan konstruksi filogenetik pada penelitian ini menggunakan metode *neighbor joining tree* dengan 1000 pengulangan (*bootstrap*). Hasil konstruksi filogenetik menunjukkan keberadaan 2 kelompok *in group* dan 1 kelompok *out group*. Kelompok *in group* terdiri dari 2 klade yang berasal dari spesies yang berbeda yaitu klade 1 sebagai kelompok spesies *Aplidium accareense* dan klade 2 sebagai kelompok spesies *Aplidium elegans*. Spesies yang digunakan sebagai *out group* dalam pembuatan konstruksi pohon filogenetik adalah *Polycitorella coronaria* yang berasal dari Famili Polycitoridae. Famili ini dipilih karena kelompok *in group* berasal dari Famili Polyclinidae. Kelompok *out group* ditentukan sebagai kelompok luar yang memiliki urutan genetik jauh dari taksa kelompok *in group* (DeSalle, 2023). Konstruksi pohon filogenetik yang terbentuk ini termasuk kelompok monofiletik, dimana kedua klade berasal dari famili yang sama yaitu Polyclinidae. Kelompok monofiletik mencakup leluhur yang sama dengan keturunan yang sama (Anollés *et al.*, 2023).



Gambar 5. Hasil Konstruksi Pohon Filogenetik Sampel PT02-02(B) Menggunakan Metode *Neighbor Joining Tree*

Jarak genetik yang dihasilkan dari konstruksi filogenetik pada penelitian ini sebesar 0,020, dimana jarak genetik tersebut menunjukkan tingkat kekerabatan kode sampel PT02-02(B) yang dekat dengan sekuens penyusun dalam konstruksi pohon filogenetik. Tingkat kekerabatan spesies PT02-02(B) yang dianalisis dengan sekuens penyusun dalam klade ditunjukkan dengan nilai *bootstrap*. Spesies sampel PT02-02(B) memiliki kekerabatan dekat dengan *Aplidium accarens* dalam klade I yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebesar 90%, sedangkan klade kecil 2 terdiri dari satu spesies yang sama yaitu spesies *Aplidium elegans* dengan nilai *bootstrap* 100%. Nilai *bootstrap* sekuens PT02-02(B) tersebut termasuk kategori tinggi, yang artinya memiliki kekerabatan dekat dengan *Aplidium accarens*. Nilai *bootstrap* yang kuat memiliki persentase sebesar >85%, kategori sedang sebesar 70-85%, kategori lemah sebesar 50-69%, dan kategori buruk sebesar <50% (Gildantia *et al.*, 2022). Nilai *bootstrap* yang tinggi menunjukkan bahwa pengelompokan dapat dipercaya (Subari *et al.*, 2021)

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu Spesies ascidian kolonial yang ditemukan di ekosistem terumbu karang Pulau Tidung dan Pulau Pari yang teridentifikasi secara molekuler menggunakan pendekatan DNA *barcoding* adalah spesies *Aplidium* sp. dengan kode sampel PT02-02 yang berasal dari Famili Polyclinidae. Tingkat kekerabatan spesies ascidian kolonial pada ekosistem terumbu karang Pulau Tidung didapatkan hasil bahwa sampel dengan kode PT02-02(B) termasuk dalam klade yang memiliki kemiripan dengan spesies *Aplidium accarens* yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebesar 90%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan teimakasih sebesar-besarnya kepada LPPM Undip yang telah mendanai penelitian ini melalui Skema Riset Kolaborasi Indonesia (RKI) Undip-UI-Unpad nomor kontrak 442-02/UN7.D2/PP/IV/2024.

DAFTAR PUSTAKA

Alaboodi, A.S., Shaymaa, A.K. & Ahmed, S.H. 2025. Ultraviolet-visible spectroscopy, importance, principle, structure and most important applications: A study review.

International Journal of Novel Research in Physics Chemistry & Mathematics, 12(1): 53–60. doi: 10.5281/zenodo.14965556

Ali, A.J. & Kan, K. 2019. DNA barcoding as tool for identification of ascidians from Indian coast. *Indian Journal of Ecology*, 46(7): 60–66.

Anggreni, L.D., Dewi, N.M.R.K., Mahardika, I.G.N.K. & Putra, I.G.N.N. 2024. Optimisation of PCR primer concentration and annealing temperature in PCR test method for African swine fever virus detection. *Buletin Veteriner Udayana*, 16(1): 218–224. doi: 10.24843/bvu.v16i1.88

Angkouw, A.L., Rumengan, I.F., Rimper, J.R., Ompi, M., Sumilat, D.A. & Bara, R.A. 2023. Identifikasi molekuler spesies mikroba fotosintetik yang berasosiasi dengan Ascidiacea di Teluk Manado. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 11(3): 255–263. doi: 10.35800/jplt.11.3.2023.54003

Anissa, R.K., Lisdiana, L. & Widayanti, A.T. 2024. Optimasi metode nested PCR untuk deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1): 1–13.

Anollés, G.C., Jean, M.C. & Arshan, N. 2023. A critical analysis of the current state of virus taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1240993. doi: 10.3389/fmicb.2023.1240993

Ayuningrum, D., Liu, Y., Riyanti, R., Sibero, M.T., Kristiana, R., Asagabaldan, M.A. & Schaeberle, T.F. 2019. Tunicate-associated bacteria show a great potential for the discovery of antimicrobial compounds. *PLoS One*, 14(3): e0213797. doi: 10.1371/journal.pone.0213797

Ayuningrum, D., Kristiana, R., Asagabaldan, M.A. 2020. Potensi Bakteri Asosiasi Tunikata Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Guna Menghambat Pertumbuhan Bakteri Multidrug Resistant. *Jurnal Pasir Laut*, 4 (2): 102-107.

Ayuningrum, D., Shukor, M.Y., Patria, M.P., Pasaribu, B. & Sulistiowati, S. 2025. Exploring plastic-degrading enzyme producers from ascidian-associated bacteria in Karimunjawa Islands, Indonesia. *Biodiversitas*, 26(3): 1050–1060.

Baraze, A., Cristina, M., Courti, I., Ibtissam, C., Florent, P.S., Sebastien, A., Philippe, G. & Thomas, M. 2025. Mercury-free lamp-phosphor coupling for UVC surface

- decontamination. *Plasma Medicine*, 15(1): 33–52.
- Coppock, A.G., Kingsford, M.J. & Jones, G.P. 2024. Importance of complex sponges as habitat and feeding substrata for coral reef fishes. *Marine Biology*, 171: 154. doi: 10.1007/s00227-024-04467-6
- Darmawan, M., Fadhlullah, R., Muhammad, R., Siratani, S., Bayu, S., Mohammad, A., Arief, S., Amanda, T.P. & Fery, K. 2025. Satellite-based biodiversity index evaluation in Tidung shallow water island to support marine zonation mapping. *Inflection: Bio Web Of Conferences*, 176: 01008. doi: 10.1051/bioconf/202517601008
- DeSalle, R., Apurva, N. & Michael, T. 2023. Multiple outgroups can cause random rooting in phylogenomics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 184: 107806. doi: 10.1016/j.ympev.2023.107806
- Eckhardt, S., Ainsworth, T. D., Leggat, W., and Page, C. E. 2024. Colonial Ascidian Populations at Inshore Coral Reefs of Norfolk Island, South Pacific. *Diversity*, 16(384): 1–15. doi: 10.3390/d16070384
- Fauzan, A.F. & Burhanuddin, A. 2023. Potensi dan tantangan pariwisata maritim Kepulauan Seribu. *Student Scientific Creativity Journal*, 1(6): 379–391. doi: 10.55606/sscj-amik.v1i6.2391
- Fauzanabri, R., Indri, S.M., Joshian, N.W.S., Hermanto, W.K., Manengkey, C.A.L.S. & Edwin, L.A.N. 2021. Status terumbu karang di perairan Pulau Tidung Kepulauan Seribu Provinsi DKI Jakarta berbasis analisis underwater photo transect. *Jurnal Ilmiah Platax*, 9(2): 1–15.
- Gallo, A., Penna, Y.M., Russo, M., Rosapane, M., Tosti, E. & Russo, G.L. 2024. An organic extract from ascidian *Ciona robusta* induces cytotoxic autophagy in human malignant cell lines. *Frontiers in Chemistry*, 12: 1322558. doi: 10.3389/fchem.2024.1322558
- Ghasemi, M., Ghattavi, S., Qeshmi, F.I. & Homaei, A. 2024. Separation and identification of bacteria producing protease from the intestine of *Sillago sihama* and *Rastrelliger kanagurta*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 59: 103242. doi: 10.1016/j.bcab.2024.103242
- Gildantia, E., Ferniah, R.S., Budiharjo, A., Supriyadi, A., Zainuri, M. & Kusumaningrum, H.P. 2022. Identifikasi spesies mikroalga dari BBPBAP Jepara secara morfologi dan molekuler menggunakan 18S rDNA. *Buletin Oseanografi Marina*, 11(2): 167–176. doi: 10.14710/buloma.v11i2.39703
- Handayani, M. & Citra, S.U.D. 2023. Ekosistem terumbu karang di Pantai Tawang, Kabupaten Pacitan. *Journal of Marine Research*, 12(4): 623–629. doi: 10.14710/jmr.v12i4.38669
- Hebert, R. and Megléc, E. 2022. NSDPY: A Python package to download DNA sequences from NCBI. *SoftwareX*, 18: 101038. doi: 10.1016/j.softx.2022.101038
- Jacobi, Y., Gitai, Y. & Noa, S. 2018. Efficient filtration of micron and submicron particles by ascidians from oligotrophic waters. *Limnology and Oceanography*, 63(S1): 267–279. doi: 10.1002/lno.10736
- Järnegren, J., Gulliksen, B., Husa, V., Malmstrøm, M., Oug, E., Berg, P.R. & Velle, G. 2023. Assessment of risk and risk-reducing measures related to the introduction and dispersal of the invasive alien carpet tunicate *Didemnum vexillum* in Norway. Norwegian Scientific Committee for Food and Environment, 125 pp.
- Kayama, K., Miyuki, K., Naoto, C., Misaki, T., Reika, Y., Kiwamu, H., Gerry, A.C. & Daiji, E. 2021. Prediction of PCR amplification from primer and template sequences using recurrent neural network. *Scientific Reports*, 11: 7493. doi: 10.1038/s41598-021-86357-1
- Krasovec, G., Biasuz, K., Thomann, L.M. & Chambon, J.P. 2021. Solitary ascidians. In *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology*, CRC Press, 357–384.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549.
- Kusuma, A.B. 2022. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR untuk identifikasi molekuler pada empat jenis karang lunak berbeda. *Jurnal Enggano*, 7(2): 175–182. doi: 10.31186/jengano.7.2.175-182
- Leonard, O., Haryoto, K. & Ita, J. 2020. Analisis wisata selam berkelanjutan (studi kasus: daya dukung lingkungan terumbu karang untuk wisata selam di Pulau Pari, Kepulauan Seribu). *Jurnal DRD*, 13(1): 29–40. doi: 10.37439/jurnaldrd.v13i1.22
- Lukowiak, M., Simina, D.D. & Viorel, I. 2016. First fossil record of early Sarmatian didemnid ascidian spicules (Tunicata) from Moldova.

- Geobios*, 49(3): 201–209. doi: 10.1016/j.geobios.2016.01.020
- Menchhoff, S.I., Delacruz, M.T., Hytinen, M.E., Cox, J.O., Miller, M.T. & Dawson Cruz, T. 2020. DNA purification cell lysis and wash step modifications for low-template DNA sample processing. *Journal of Forensic Sciences*, 65(2): 597–600. doi: 10.1111/1556-4029.14203
- Mujipradhana, V. N., Wewengkang, D. S., & Suryanto, E. 2018. Aktivitas Antimikroba dari Ekstrak Ascidian *Herdmania momus* pada Mikroba Patogen Manusia. *Pharmakon*, 7(3): 338–347. doi: 10.35799/pha.7.2018.20601
- Naully, P.G. & Sepriliyana, N. 2022. Pemanfaatan multiplex nested polymerase chain reaction untuk deteksi patogen penyebab infeksi kongenital. *Jurnal Kesehatan Vokasional*, 7(1): 51–60. doi: 10.22146/jkesvo.64469
- Nugroho, K., Terryana, R.T., Rijzaani, H. & Lestari, P. 2016. Metode ekstraksi DNA pada *Jatropha* spp. tanpa menggunakan nitrogen cair. *Jurnal Littri*, 22(4): 159–166. doi: 10.21082/littri.v22n4.2016.159-166
- Oliveira, F.A., Michonneau, F. & da Cruz Lotufo, T.M. 2017. Molecular phylogeny of Didemnidae (Ascidacea: Tunicata). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 180(3): 603–612. doi: 10.1093/zoolinlean/zlw002
- Palit, C., Aulina, A., Roring, R.T., Rori, J. & Sumilat, D.A. 2022. Aktivitas anti-UV sediaan sabun dengan penambahan ekstrak *Ascidia Lissoclinum* sp. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 10(1): 89–94. doi: 10.35800/jplt.10.1.2022.55004
- Pangsuma, N. S., & Hidayat, T. 2023. The Urgency of Understanding Taxonomy in Learning Biology. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 9(4): 95-110. doi: 10.22437/biodik.v9i4.31092
- Perwitasari, D.A., Faridah, I.N., Ratnasari, Y.A., Agustina, K., Utami, I.N. & Maliza, R. 2020. Uji banding metode isolasi DNA sampel FTA card menggunakan kit Wizard® Genomic DNA Purification, PureLink® Genomic DNA dan Chelex-100. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 18(2): 241–245.
- Piri, R., Magdalena, L. & Dody, P. 2022. Biodiversity of tunicate (Ascidacea) in the waters of Badi Island, Pangkajene Regency of South Sulawesi. *International Journal of Applied Biology*, 6(1): 149–155. doi: 10.20956/ijab.v6i1.20401
- Puspitasari, A., Budiarsa, I. M., Ashari, A., Dhafir, F., Windarsih, Y., & Trianto, M. 2025. Analisis Filogenetik Cryptic species *Apis cerana* Fabricius, 1793 Berdasarkan Gen 16S rRNA. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13(1): 521-530. doi: 10.33394/bioscientist.v13i1.14967
- Procházka, P. & Holub, J. 2019. On-line searching in IUPAC nucleotide sequences. *Biomedical Engineering Systems and Technologies*, 97(8): 66–77. doi: 10.5220/0007382900660077
- Roth, S.K., Powell, A., Smith, D.J., Roth, F. & Schierwater, B. 2018. The highly competitive ascidian *Didemnum* sp. threatens coral reef communities in the Wakatobi Marine National Park, Southeast Sulawesi, Indonesia. *Regional Studies in Marine Science*, 24(1): 48–54. doi: 10.1016/j.rsma.2018.07.001
- Senthamarai, Meenakshi, V. K., & Gomathy, S. 2018. Six Species of Ascidiaceans of the Family Didemnidae as New Records to Gulf of Mannar, India. *Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 6: 127-139.
- Sihotang, M.A.E.D., Yola, E.E., Eniek, S. & Erita, L. 2021. Desain primer dan analisis in silico untuk amplifikasi gen mt-CO1 pada tikus got (*Rattus norvegicus*). *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug*, 1(2): 20–29. doi: 10.54384/eruditio.v1i2.82
- Singh, U.A., Kumari, M. & Iyengar, S. 2018. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological Procedures Online*, 20: 7. doi: 10.1186/s12575-018-0077-6
- Sophian, A., Ratna, P., Muindar, M., Eka, P.J.I. & Muhammad, L.A. 2021. Analysis of purity and concentration of DNA extracted from intron patho gene-spin extraction. *Asian Journal of Tropical Biotechnology*, 18(1): 28–31. doi: 10.13057/biotek/c180103
- Stefaniak, L., Lambert, G., Gittenberger, A., Zhang, H., Lin, S., Whitlatch, R.B. 2009. Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. *Aquatic Invasions*, 4(1): 29-44. doi: 10.3391/ai.2009.4.1.3
- Suadi, Z., Bilung, L.M., Apun, K. & Azmi, A.A. 2020. Efficiency of traditional DNA extraction method in PCR detection of porcine DNA. *Jurnal Teknologi*, 82(5): 85–90. doi: 10.11113/jt.v82.14636

- Subari, A., Razak, A. & Sumarmin, R. 2021. Phylogenetic analysis of *Rasbora* sp. based on the mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1): 89–94. doi: 10.29303/jbt.v21i1.2351
- Viard, F., Roby, C., Turon, X., Bouchemousse, S. & Bishop, J. 2019. Cryptic diversity and database errors challenge non-indigenous species surveys: An illustration with *Botrylloides* spp. in the English Channel and Mediterranean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 6: 615. doi: 10.3389/fmars.2019.00615
- Yang, H., Qingqian, Z., Jingjie, H., Zhenmin, B., & Mengqiang, W. 2024. A Chelex-100-based Rapid DNA Extraction Method and Its Application in the Detection of Shrimp Pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology*, 70: 29-37. doi: 10.1016/j.ejbt.2024.04.004
- Yuenleni, Y. 2019. Langkah-langkah optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(3): 51–56.
- Zafeiropoulos, H., Gargan, L., Hintikka, S., Pavludi, C. & Carlsson, J. 2021. The dark mAtteR iNvestigator (DARN) tool: Getting to know the known unknowns in COI amplicon data. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5: 163–174. doi: 10.3897/mbmg.5.69657