

Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA,
Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta, 16 Mei 2009

METODE SIDIK JARI DNA DENGAN *REP*-PCR

Yuyun Farida

Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY

Abstrak

Analisis *repetitive genomic sequences*- *Polymerase Chain Reaction* (*rep*-PCR) adalah metode pelipatgandaan DNA menggunakan *primer* oligonukleotida untuk mengamplifikasi urutan nukleotida repetitif dalam genom mikrobia. Setiap mikroorganisme memiliki sekuen berulang (*repetitive sequence*) dengan jumlah dan ukuran yang sangat bervariasi.

Sidik jari genomik *rep*-PCR yang sering digunakan ada tiga macam yaitu *REP*-PCR, *ERIC*-PCR, dan *BOX*-PCR. Tiga macam sekuen repetitif yang telah diidentifikasi, yaitu elemen *REP* (*Repetitive Extragenic Palindromic*), *ERIC* (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), dan elemen *BOX*. *Primer rep*-PCR didesain untuk mengamplifikasi DNA diantara dua perbatasan fragmen DNA berulang pada genom bakteri.

Teknik *rep*-PCR merupakan salah satu teknik untuk menghasilkan sidik jari genom bakteri yang dapat digunakan untuk membedakan keragaman mikrobia berdasarkan jumlah dan ukuran sekuen repetitif bakteri. Metode ini dapat digunakan sebagai salah satu metode penapisan awal isolat-isolat bakteri yang belum teridentifikasi. Selain itu juga untuk memilih isolat-isolat dengan pola amplifikasi yang berbeda untuk keperluan identifikasi lanjut. Metode ini cukup efektif dan efisien digunakan dalam sidik jari DNA bakteri.

Kata kunci : sidik jari DNA, *rep*-PCR, *REP* PCR, *ERIC* PCR, *BOX* PCR

PENDAHULUAN

Identifikasi dan klasifikasi bakteri banyak diperlukan dalam berbagai bidang penelitian seperti kedokteran, lingkungan, industri, pertanian, dan lain sebagainya. Berbagai metode untuk keperluan tersebut telah diaplikasikan dengan berbagai kelebihan dan kekurangan masing-masing.

Sidik jari DNA (*DNA fingerprinting*) merupakan suatu teknologi DNA untuk melihat keragaman individu, dapat untuk membedakan individu yang dekat kekerabatannya sekalipun. Pemeriksaan DNA semakin banyak digunakan untuk menganalisis bahan biologis karena DNA memiliki beberapa keunggulan diantaranya DNA bersifat spesifik (setiap makhluk hidup mempunyai sekuen DNA yang unik), relatif stabil, dapat diperbanyak secara invitro (dapat menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)), dan pada organisme tingkat tinggi distribusinya luas yaitu hampir pada semua sel tubuh. Metode sidik jari DNA dapat diterapkan pada semua makhluk hidup, baik prokariotik maupun eukariotik (Madigan *et al*, 2009).

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro* menggunakan mesin PCR. Metode ini sekarang banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik karena metode tersebut sangat sensitif. Pada awalnya hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA tetapi sekarang digunakan pula untuk melipatgandakan molekul mRNA (Yuwono, 2006). Komponen utama dalam PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) *primer* oligonukleotida, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang penting yaitu senyawa bufer. Reaksi PCR dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan (suhu tinggi sekitar 95°C, waktu 1-2 menit) sehingga DNA rantai ganda terpisah menjadi rantai tunggal. Kemudian suhu

diturunkan (sekitar 55°C) untuk penempelan *primer* (*annealing*) pada DNA cetakan rantai tunggal. *Primer* akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan pada sekuen yang komplementer dengan sekuen *primer*. Setelah itu suhu dinaikkan menjadi sekitar 72°C untuk proses polimerasi (pemanjangan rantai DNA yang akan digandakan). Setelah proses pemanjangan selesai, DNA akan didenaturasi lagi pada suhu tinggi (95°C). Proses tersebut diulangi lagi hingga 25-30 siklus sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda baru yang sudah berlipatganda (Sambrook *et al*, 1989).

Analisis sidik jari DNA dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya menggunakan metode PCR. Sidik jari DNA dengan metode PCR lebih mudah dilakukan karena tidak memerlukan enzim restriksi, tidak memerlukan hibridisasi dengan suatu pelacak tertentu, tidak memerlukan pemindahan fragmen-fragmen DNA dari gel ke suatu membran, dan dapat dilakukan terhadap sampel DNA dalam jumlah sedikit (Yuwono, 2006). Sidik Jari DNA dengan *rep*-PCR dapat digunakan untuk membedakan isolat-isolat bakteri hingga ke spesies, subspecies, dan strain. Metode ini juga dapat diaplikasikan terhadap berbagai macam mikroorganisme baik dari golongan bakteri Gram-negatif maupun Gram-positif, bahkan pada mikroorganisme eukaryotik (Versalovic *et al*, 1996).

PEMBAHASAN

Sidik Jari DNA dengan *rep*-PCR

Teknik *rep*-PCR merupakan salah satu teknik untuk menghasilkan sidik jari genom bakteri (Rademaker, 2005), yang dapat digunakan untuk membedakan keragaman mikrobial berdasarkan jumlah dan ukuran sekuen repetitif bakteri. Teknik ini sering digunakan agar tidak meneliti isolat bakteri yang ternyata sama berdasarkan sidik jari genetiknya. Metode *rep*-PCR sering digunakan sebagai salah satu metode penapisan (*screening*) awal isolat-isolat bakteri yang tidak beraturan dengan pola amplifikasi yang berbeda. Penapisan bakteri biasanya dilakukan sebelum dilakukan identifikasi lebih lanjut seperti sekuensing gen 16S rRNA. Prosedur ini cukup sensitif, mudah digunakan, dan dapat diaplikasikan terhadap jumlah *strain* yang banyak (Pathom-aree *et al.*, 2006).

Analisis *repetitive genomic sequences*-PCR (*rep*-PCR) adalah metode sidik jari DNA dengan PCR menggunakan primer oligonukleotida untuk mengamplifikasi urutan nukleotida repetitif dalam genom mikrobial (Schneegurt *et al.*, 1998). Setiap mikroorganisme memiliki sekuen berulang (*repetitive sequence*) dengan jumlah dan ukuran yang sangat bervariasi yang secara alami tersebar secara acak pada kromosom. Sekuen repetitif inilah yang digunakan sebagai dasar sidik jari DNA.

Tiga macam sekuen repetitif yang biasa digunakan dalam identifikasi, yaitu sekuen REP (*repetitive extragenic palindromic*) berukuran 35-40 bp, ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) berukuran 124-127 bp, dan BOX berukuran 154 bp pada spesies *Streptococcus pneumoniae* (Versalovic *et al.*, 1994). Sekuen repetitif ini terdapat pada kromosom terletak pada lokasi yang berbeda-beda dan tersebar berselingan pada kromosom bakteri.

Tiga macam sidik jari genomik *rep*-PCR berdasarkan jenis sekuen repetitifnya yaitu REP-PCR, ERIC-PCR dan BOX-PCR. *Primer* oligonukleotida didesain untuk mengamplifikasi ketiga sekuen repetitif ini yaitu mengamplifikasi DNA diantara dua perbatasan fragmen DNA berulang pada genom bakteri. Ketiga jenis *rep*-PCR ini masing-masing mempunyai karakteristik yang berbeda-beda.

Sadowsky *et al.* (1996) menunjukkan bahwa dengan menggunakan *primer* BOXA1R dalam *rep*-PCR (BOX-PCR) mampu membedakan *Streptomyces* sampai pada level *strain* dan menunjukkan bahwa resolusi *rep*-PCR dengan *primer* BOXA1R lebih baik dibandingkan *primer* REP dan ERIC. BOXA1R merupakan *primer* oligonukleotida tunggal yang dapat menghasilkan sidik jari DNA yang cukup baik. Sepasang *primer* ERIC mampu menghasilkan profil yang cukup kompleks namun sensitif terhadap kondisi PCR, seperti adanya kontaminan dalam preparasi DNA (Rademaker, 2005). Penelitian yang dilakukan Moraes *et al* (2000) menggunakan *primer* REP dan ERIC untuk melihat keragaman genetik *Bacteroides fragilis*. *Primer* ERIC menghasilkan fragmen DNA lebih banyak dibandingkan REP. Metode ini dirasa cukup sederhana dan reliabel, sehingga dapat digunakan untuk deteksi cepat *Bacteroides fragilis*. Genersch & Otten (2003) menggunakan *primer* BOXA1R, MBO REP1, dan *primer* ERIC untuk mengidentifikasi *Paenibacillus larvae*

subsp. *larvae*. Hasilnya ketiga *primer* tersebut mampu menghasilkan pola sidik jari DNA yang cukup jelas. Kombinasi *primer* BOXA1R dan MBO REP1 dapat digunakan sebagai cara efektif dalam penelitian epidemiologi *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Elbouthiri *et al* (2009) membandingkan beberapa metode *genotyping* DNA (*rep*-PCR, RAPD, ARDRA) pada *Sinorhizobium meliloti* dan *Rhizobium sulae*. Hasilnya menunjukkan bahwa *rep*-PCR dengan *primer* REP dan ERIC lebih baik dibandingkan metode RAPD dan ARDRA untuk isolat *Sinorhizobium meliloti*. Sedangkan *rep*-PCR dengan *primer* REP dan metode ARDRA (dengan enzim restriksi *Hinf*I) lebih baik dibandingkan metode lain.

Prosedur Sidik Jari DNA dengan *rep*-PCR

Pada prinsipnya cara kerja dalam melakukan sidik jari DNA tergantung jenis organisme yang akan diteliti. Untuk itu perlu dilakukan optimasi prosedur yang dipakai, seperti cara preparasi DNA, jumlah campuran reaksi PCR yang akan dilakukan, jenis *primer* yang akan digunakan, bahan-bahan lain yang digunakan, metode yang dipilih, dan lain sebagainya. Prosedur yang sudah ada biasanya sebagai acuan dalam melakukan penelitian, tetapi peneliti perlu melakukan optimasi sendiri untuk memperoleh hasil yang baik.

1. Preparasi DNA *template* (DNA cetakan).

Prosedur pertama yang harus dilakukan dalam melakukan *rep*-PCR adalah menyiapkan DNA untuk cetakan. Metode preparasi DNA cetakan untuk *rep*-PCR disesuaikan dengan sifat mikrobial yang akan dianalisis, misalnya pemilihan bufer yang digunakan untuk melisis dinding sel bakteri serta cara kerja yang juga bervariasi untuk masing-masing jenis bakteri. DNA cetakan untuk *rep*-PCR ini dapat diperoleh dari hasil isolasi DNA kromosom maupun menggunakan sel bakteri utuh tanpa proses isolasi DNA terlebih dahulu.

Preparasi DNA cetakan dengan cara isolasi DNA bakteri seperti yang dilakukan dalam Sambrook *et al* (1989) dengan beberapa modifikasi sesuai keperluan. Kultur cair bakteri sebanyak 3 ml disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang, pelet ditambah 150 µl bufer lisis (100 mM Tris HCl pH 8; 100 mM NaCl; 50 mM EDTA; 2% SDS), kemudian divorteks, ditambah 2 µl proteinase-K (10mg/ml), digojog kuat-kuat selama 15 menit kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit agar enzim proteinase-K bekerja. Setelah itu suspensi disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit, supernatan diambil, ditambah fenol 200 µl, digojog pelan selama 30 menit, kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung lain, kemudian dilakukan presipitasi DNA dengan etanol 96% dingin, dicampur pelan-pelan hingga tampak benang-benang halus (DNA kromosom yang terisolasi). DNA kromosom diendapkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, kemudian dicuci dengan etanol 70%, dikering anginkan, setelah itu diencerkan dengan akuabides atau TE (Tris HCl-EDTA), kemudian disimpan pada suhu -20°C jika belum akan digunakan.

Penelitian yang dilakukan Schneider dan de Bruijn (1996) dengan sampel *A. caulinodulans* dan *R. meliloti*, cara yang dilakukan dalam mempersiapkan sel utuh dari kultur cair adalah sebagai berikut : 3 ml kultur cair bakteri (OD 0.65-0.95) disentrifugasi hingga diperoleh pelet, kemudian pelet dicuci dengan NaCl 1M, diulangi beberapa kali untuk kultur sel yang menghasilkan polisakarida. Pelet sel tersebut diresuspensi dengan 100 µl akuabides, disimpan pada suhu -20°C jika belum akan digunakan. Diambil 1-2 µl suspensi sel untuk cetakan DNA tiap satu kali PCR.

Sel utuh dari koloni tunggal pada cawan petri juga dapat digunakan untuk preparasi DNA cetakan. Metode yang pernah dilakukan pada bakteri *Rhizobium sp.*, *Clavibacter michiganensis* subsp., *E. Coli*, berbagai bakteri xanthomonads dan pseudomonads, dan beberapa bakteri lain seperti yang dilakukan Rademaker dan de Bruijn(2000) adalah sebagai berikut : isolat bakteri koloni tunggal diambil menggunakan *loop* inokulasi *disposable*, kemudian dimasukkan ke dalam tabung PCR yang sudah berisi campuran komponen PCR, kemudian diresuspensi. Setelah itu langsung dilakukan PCR. Metode ini memungkinkan untuk dilakukan walaupun dengan sel utuh bakteri karena pada waktu suhu inkubasi PCR mencapai 95°C (yang bertujuan untuk mendenaturasi DNA), suhu tersebut juga cukup untuk merusak dinding sel yang memungkinkan *primer* oligonukleotida menempel pada DNA cetakan yang terdapat pada sel (Yuwono, 2006).

Metode lain preparasi DNA cetakan dari sel utuh yaitu dengan cara sel bakteri diberi lisis alkalin terlebih dahulu jika sel bakteri termasuk jenis yang sulit lisis. Prosedur preparasinya adalah sebagai berikut : suspensi sel sebanyak 10 µl atau dari koloni ditambah 100 µl NaOH 0,05 M kemudian diinkubasi pada suhu 95°C selama 15 menit, setelah itu disentrifugasi selama 2 menit

dengan kecepatan 14.000 rpm. Setiap satu kali reaksi *rep*-PCR menggunakan 1 µl supernatan yang dihasilkan.

2. Reaksi amplifikasi DNA dengan *rep*-PCR

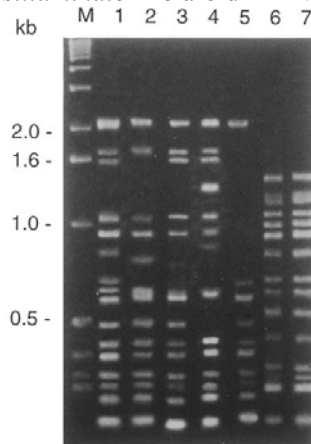
Komposisi larutan reaksi PCR disesuaikan dengan kebutuhan. Contoh komposisi PCR adalah sebagai berikut, 1 µl *primer* 16,5 pmol (d disesuaikan dengan jenis *rep*-PCR yang dilakukan yaitu *primer* khusus, misalnya untuk *rep* BOX (BOXA1R), ERIC (ERIC1R, ERIC2), REP (REP1R, REP2)), sampel DNA cetakan 1 µl (50 ng), larutan *master mix* PCR 6 µl (sudah mengandung dNTP, enzim *Taq polymerase*, MgCl₂, dan bahan lain), serta akuabides steril (dH₂O) 4 µl. Ukuran ini dapat diubah sesuai kebutuhan dan untuk memperoleh hasil yang paling optimal. Program yang digunakan dalam PCR (Rademaker dan de Bruijn, 1998) adalah denaturasi awal 95°C selama 7 menit dan proses selanjutnya sebanyak 30 siklus yang terdiri dari denaturasi (pemisahan DNA rantai ganda menjadi rantai tunggal), penempelan primer/*annealing* dan polimerasi (pemanjangan rantai DNA). Setelah akhir siklus, polimerasi dilanjutkan pada suhu 68°C selama 10 menit. Siklus PCR yang digunakan dapat berpedoman pada Tabel 1, tetapi masih dapat diubah untuk memperoleh hasil yang paling optimal.

Tabel 1. Siklus *rep*-PCR

Siklus	BOX	ERIC	REP
Denaturasi	94°C, 1 menit	94°C, 1 menit	94°C, 1 menit
Penempelan Primer	53°C, 1 menit	52°C, 1 menit	40°C, 1 menit
Pemanjangan DNA	65°C, 8 menit	65°C, 8 menit	65°C, 8 menit

3. Analisis Hasil PCR

Visualisasi hasil PCR dapat dilakukan dengan menggunakan *polyacrilamid gel electrophoresis* (PAGE) 8-12% dengan pewarnaan perak nitrat (*silver staining*). Selain itu dapat juga menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5-2% dengan pewarna ethidium bromide untuk visualisasi DNA dibawah sinar ultraviolet. Contoh hasil visualisasi *rep*-PCR dengan agarose dapat dilihat pada Gambar 1. Gambar tersebut merupakan hasil visualisasi ERIC-PCR sampel bakteri *B. fragilis* dengan elektroforesis gel agarose 1,5%, pewarna ethidium bromide, dan dilihat dibawah UV *transilluminator* Polaroid MP4 *System* (Moraes *et al*, 2000).

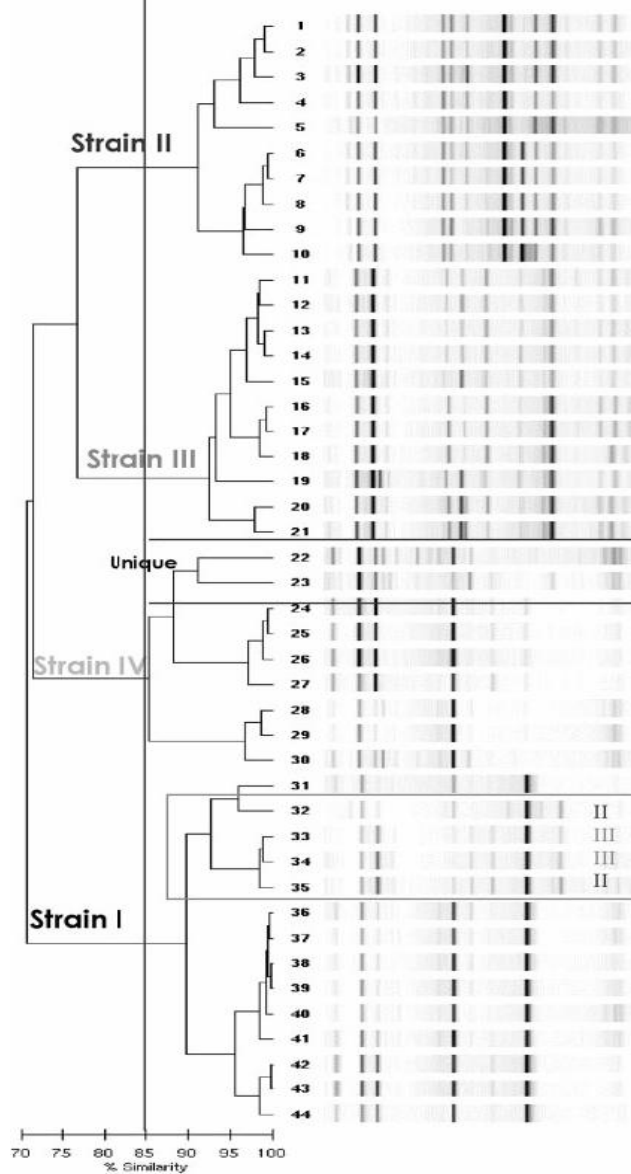


Gambar 1. Hasil Visualisasi DNA ERIC-PCR. M : Marker 1 KB DNA Ladder, 1-7 : Hasil ERIC-PCR sampel bakteri *B. fragilis* (Moraes *et al*, 2000)

4. Analisis Cluster Hasil Visualisasi Sidik Jari DNA

Hasil sidik jari DNA dianalisis *cluster*, dengan bantuan program komputer, misalnya program NTSYS menggunakan *product moment* dan metode UPGMA (*Unweighted Pair Groups with Arithmetical Averages*). Hasilnya berupa dendrogram dengan nilai similaritas tertentu antar isolat. Analisis sidik jari DNA ini digunakan untuk mengetahui keragaman isolat-isolat bakteri yang diperoleh. Bakteri yang mempunyai pola sidik jari DNA dengan nilai similaritas tinggi, diasumsikan merupakan isolat bakteri yang dekat kekerabatannya secara genetik. Contoh dendrogram hasil analisis cluster *rep*-PCR terdapat pada Gambar 2 yang merupakan hasil *rep*-PCR dan hasil analisis *cluster* berupa dendrogram yang dikerjakan menggunakan program *rep*-PCR

otomatis (DiversiLab System) terhadap sampel bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Ross *et al.*, 2005).



Gambar 3. Dendrogram rep-PCR dari 44 sampel isolat MRSA (Ross *et al.*, 2005).

Dengan dikembangkannya metode *rep*-PCR secara otomatis menggunakan program khusus, pengerjaan *rep*-PCR menjadi lebih mudah, cepat, akurat, dan lebih murah dibandingkan cara manual. Salah satu yang sudah dikembangkan adalah DiversiLab system. (Rademaker *et al.*, 2005). Penelitian yang dilakukan Ross *et al.* (2005) bertujuan membandingkan metode *genotyping* DNA bakteri PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) dengan *rep*-PCR otomatis dengan DiversiLab system. Hasilnya menunjukkan bahwa *rep*-PCR dapat digunakan untuk identifikasi MRSA secara cepat dengan hasil yang terstandarisasi, dan sangat reproduibel, sehingga dapat digunakan untuk penapisan awal. Healy *et al.* (2005) juga mengemukakan hasil penelitiannya bahwa *rep*-PCR dengan DiversiLab system memperoleh hasil yang cukup baik untuk mendeteksi DNA *Neisseria meningitis*, yaitu cukup nyaman dan cepat.

PENUTUP

Metode sidik jari DNA bakteri dapat dilakukan dengan berbagai cara. Setiap metode mempunyai kelebihan dan kekurangan masing-masing. Metode *rep*-PCR merupakan salah satu cara yang cukup efektif dan efisien untuk identifikasi awal isolat-isolat bakteri. Pemilihan jenis *primer* dalam *rep*-PCR supaya menghasilkan pola sidik jari DNA yang spesifik disesuaikan dengan jenis bakteri yang akan diteliti.

DAFTAR PUSTAKA

- De Bruijn, F. J., 1992, Use repetitive (repetitive extragenic polindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genome of rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2180-2187.
- Elboutahiri, Nadia, Imane Thami-Alami, E. Zaid, S. M. Udupa, 2009, Genotypic Characterization of Indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sulae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA Analysis. *African Journal of Biotechnology* Vol 8 (6). Pp. 979 – 985, 20 March 2009.
- Genersch, Elke, C. Otten, 2003, The Use of Repetitive Element PCR Fingerprinting (rep-PCR) for Genetic Subtyping of German Field Isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie* (2003) 195 – 206.
- Healy, Mimi, J. Huong, T. Bittner, M. Lising, S. Frye, S. Raza, R. Schrock, J. Manry, A. Renwick, R. Nieto, C. Woods, J. Versalovic, J.S. Lupski, 2005, Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 199 – 207.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2009, Brock Biology of Microorganisms, 10th edition. *Prentice Hall International, Inc.* New Jersey, USA.
- Moraes, S. R., Goncalves, Mouton, Seldin, Ferreira, and Domingues, 2000, Use of rep-PCR to define genetic relatedness among *Bacteroides fragilis* strains. *J. Med. Microbiol.*-Vol. 49, 279-284.
- Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2006, Diversity of actinocetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench, *Extremophiles* (2006) 10:181 – 189.
- Rademaker, J. L. W, Aarts, H. J. M., Vinuesa, P., 2005, Molecular typing of Environmental isolates dalam *Molecular Microbial Ecology*. Taylor and Francis Group.
- Rademaker, J.L. and de Bruijn, F.J., 2000, Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *Michigan State University*. USA.
- Ross, T. L., W. G. Merz, M. Farkosh, and K. C. Carroll, 2005, Comparison of an Automated Repetitive Sequence-Based PCR Microbial Typing System to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Analysis of Outbreaks of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2005, p. 5642 – 5647.
- Sadowsky, M. J., L. L. Kinkel, J.H. Bowers and J.L. Schottel., 1996, Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3489-3493.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, dan T. Maniatis., 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, USA
- Schneegurt, M. A. dan Kulpa, C.F., 1998, The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. *Biotec. Appl. Biochemistry* 27: 73-79
- Versalovic, J, Lupski J.R., 1996, Distinguishing bacterial and fungal pathogens by repetitive sequence-based PCR. *Lab Med Int* 8: 12-15
- Vinuesa, P., J. I. W. Rademaker, F. J. de Bruijin and D. Werner., 1998, Genotypic characterization of Bradyrhizobium strain nodulating endemic woody legumes of the canary island by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2096-2104.
- Yuwono, Triwibowo, 2006, *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi Yogyakarta.