

PENENTUAN SPESIES BAKTERI *PSEUDOMONAS* DAN ANALISIS *PHYLOGENETIC TREE* SECARA BIOINFORMATIKA

(*Determination of Pseudomonas Bacteria Species and Analysis of Phylogenetic Tree
using Bioinformatics Method*)

Yoyon Suyono

Baristand Industri Pontianak, Jl. Budi Utomo No. 41 Pontianak

E-mail : yo2nsu@yahoo.com

ABSTRACT. *Bioinformatics is the application of information technology in the field of biology by organizing and analyzing genetic data from a database of DNA, RNA and proteins into meaningful biological information. One role of bioinformatics is to identify the unknown bacteria and analysis of phylogenetic relationships based on genetic information is relatively easy, quick and cheap. The research aims to determine species and analyzed the phylogenetic tree bacteria of the genus Pseudomonas in Bioinformatics. Research conducted through the stages of isolation, testing and continuing 16S rRNA bioinformatics studies include, for studies using the Basic Local Alignment Similarity Search Tool (BLAST) from NCBI, Multiple Sequence Alignment (MSA) using Clustal W from the EMBL-EBI and visualization in a phylogenetic tree using the Tree View software. Isolation is obtained 2 (two) isolates the code 251 and 252. Testing 16S rRNA sequences of nucleotides in Fasta format. BLAST analysis in GenBank database of identity obtained respectively 99%, E-value 0.0 and the value of bits score above 50, Pseudomonas aeruginosa strains MZA-85 and Pseudomonas sp. J16. Multiple sequence alignment (MSA) and visualization of tree phylogenetic homologous isolates of code 251 and has a kinship with the species Pseudomonas aeruginosa Isolate 29 and isolate the code 252 with a species of Pseudomonas sp. J16 with a score of 99% and 100%. Isolates obtained by including the genus Pseudomonas species, Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas sp that has a nitrogen-fixing ability and resistance to the herbicide.*

Keywords: *bacteria, bioinformatic, phylogenetic tree, pseudomonas*

1. PENDAHULUAN

Pada umumnya penentuan spesies bakteri dapat dilakukan melalui tahapan isolasi dan identifikasi. Identifikasi bakteri merupakan langkah lanjutan dari hasil isolasi. Identifikasi ditentukan berdasarkan morfologi individu, morfologi koloni, sifat pewarnaan, persyaratan nutrisi, ciri-ciri biakan, ciri-ciri biokimia (fisiologi), komponen kimia, pathogenesis, serologi, komposisi basa *deoxyribonucleic acid* (DNA), homologi, dan sifat genetik.

(Purwoko, 2007; Pelczar, 2008; Waluyo, 2008). Konsep morfologi jarang digunakan untuk mengkarakterisasi bakteri karena kesederhanaan struktur selnya dan hanya dilakukan pada kelompok yang memiliki morfologi relatif kompleks seperti *cyanobacteria* dan *actinomycetes*. Morfologi masih digunakan dalam taksonomi bakteri, seperti pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteria* (Krieg dan Holt, 1984 dalam Pangastuti, 2006), walaupun hanya untuk membedakan

takson yang lebih tinggi. Masalah lain yang dihadapi tidak semua bakteri dapat dikulturkan serta kegagalan kultivasi karena kebutuhan nutrisi dan kondisi pertumbuhan bakteri sangat beragam dan kebergantungan intrinsik dari mikroorganisme (Felske dkk., 1998 dalam WSuf, dkk., 2002).

Setelah struktur DNA ditemukan, pendekatan yang dilakukan adalah melalui genom (keseluruhan gen) dalam penentuan spesies pada bakteri dan kekerabatan. Teknologi ini memungkinkan untuk melakukan isolasi DNA atau *ribonucleic acid* (RNA) langsung dari sampel yang diperoleh dari lingkungan yang dapat menggambarkan secara menyeluruh untuk suatu komunitas (Pangastuti, 2006). Metode ini didasarkan atas amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) terhadap urutan nukleotida gen 16S rRNA yang diikuti dengan pemotongan oleh enzim restriksi (enzim yang memotong molekul DNA). Sekuen 16S rDNA (gen yang mengkode 16S rRNA) pada makhluk hidup mempunyai sekuen yang lestari (*conserved*) sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk analisis kekerabatan (Madigan dkk., 1997 dalam Yuwono, 2006). Aplikasi teknik molekular seperti gen 16S rRNA menggunakan teknik PCR yang telah dikembangkan oleh Kary Mullis dan tim di *Cetus Corporation* pada tahun 1986. Pendekatan yang memanfaatkan kemajuan bioinformatika dan teknik PCR, saat ini merupakan salah satu cara yang relatif mudah, cepat dan murah yang dapat dilakukan (Santoso, 2001; Reddy, dkk., 2009).

Ledakan informasi dari kemajuan bioteknologi seperti data sekuen DNA dari pembacaan genom, data sekuen dan struktur protein sampai kepada data transkripsi RNA berkat teknologi *DNA chip* telah mendorong lahirnya bioinformatika. Bioinformatika sendiri merupakan penerapan teknologi informasi pada bidang biologi dengan mengorganisasi dan menganalisa data-data genetik dari *database* DNA, RNA dan protein menjadi sebuah informasi biologi yang bermakna (Witarto, 2003; Dwi dan Elfaizi, 2004; Gloria, 2005; Sonia, 2007

dalam Munifah dkk.). Perangkat utama bioinformatika adalah program (*software*) yang didukung oleh tersedianya internet (Utama, 2003). Informasi genetik di *database* ini dapat diakses melalui situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) dan *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). *Database* dalam bioinformatika, merupakan data sekuen DNA atau protein yang didapat melalui percobaan laboratorium yang biasanya disimpan dalam *file* komputer. Setiap *file* dari suatu sekuen berisi informasi mengenai asal organisme, nama sekuen dan juga nomor akses yang digunakan untuk mengidentifikasi sekuen tersebut (Mount, 2004).

Bioinformatika juga menyediakan *tool* yang esensial seperti dalam mencari kemiripan sekuen (*homology alignment*) diantaranya *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), di EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/blast/>), di DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html>) dan lain-lain (Utama, 2003). Bioinformatika dapat berfungsi menganalisa posisi suatu bakteri berbeda dengan bakteri lainnya untuk prediksi struktur dan penentuan pohon filogenetik (*phylogenetic tree*). *Tool* yang digunakan biasanya CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) atau di DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/clustal-w.html>). Menganalisa kekerabatan organisme dapat divisualisasikan dalam bentuk pohon filogenetik dengan program *TreeView* yang diunduh dari situs <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

Salah satu peran dari bioinformatika adalah dapat mengidentifikasi bakteri yang belum diketahui, menentukan hubungan filogenetik serta analisis ekosistem berdasarkan informasi genetik (Utama, 2003).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui spesies dan menganalisis pohon filogenetik bakteri genus

Pseudomonas secara bioinformatika dari hasil uji PCR isolat bakteri yang berupa sekuen 16S rRNA. Bakteri genus *Pseudomonas* memiliki peran yang penting di alam dan sangat mudah tumbuh. Beberapa spesies mempunyai kemampuan untuk mendegradasi suatu senyawa yang salah satunya logam dengan metabolisme sel yaitu *metabolisme dependent* dan *non-metabolisme dependent* (Ahalya, dkk., 2003).

2. METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan meliputi Buffered Pepton Wáter (Difco), NaCl (e Merck), Alkohol (e Merck), *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) (Difco), *Casamino Acid Media* (Difco) dan Aluminium Foil.

Peralatan meliputi wadah contoh (bahan dari gelas dan plastik), alat sampling, timbangan analitik, timbangan *top loading*, cawan petri, jarum ose, pipet tetes, pipet ukur, botol pengencer, tabung reaksi, labu ukur, gelas kimia, erlenmeyer, oven, inkubator, autoklaf, bunsen, *hot plate stirrer*, laminar flow, pinset, pH meter dan termometer.

Prosedur penelitian meliputi pengambilan contoh tanah di salah satu industri untuk isolasi bakteri (sesuai prosedur pengambilan contoh tanah untuk analisa mikroba, 2004, Balai Penelitian Tanah, Jawa Barat). Isolasi bakteri, ditimbang 25 g contoh tanah kemudian dilarutkan dalam 225 ml *Buffered Pepton Wáter*. Larutan contoh diencerkan sampai 5 kali pengenceran (10^{-5}) kemudian

diambil 1 ml dari masing-masing pengenceran bahan untuk dicampurkan dengan *Pseudomonas Isolation Agar* pada cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan posisi cawan petri terbalik. Setelah diinkubasi diamati pertumbuhan bakteri dan dipindahkan koloni yang terpisah menggunakan jarum ose ke dalam media *Casamino Acid Media* agar miring dan diinkubasi 48 jam hingga diperoleh bakteri tunggal (isolat murni). Isolat murni yang dihasilkan di analisa genetika (16S rRNA) di Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Serpong, Tangerang Banten.

Studi bioinformatika terhadap hasil PCR-16S rRNA meliputi studi kemiripan sekuen yang ada pada *database* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di situs NCBI secara *on line*, sekuen yang diperoleh disimpan dalam format FASTA pada *notepad* selanjutnya di *alignment* menggunakan Clustal W di situs EMBL-EBI secara *on line* dan divisualisasikan dalam bentuk *phylogenetic tree* menggunakan program *TreeView* yang diunduh dari situs "<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>" secara *off line*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisa PCR-16S rRNA 2 (dua) isolat yang diperoleh dengan kode 251 dan 252 berupa sekuen nukleotida dalam format FASTA seperti yang terdapat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Sekuen 16S rRNA Isolat Bakteri dalam Format FASTA

Isolat 251	Isolat 252
<p>> 251 AGGCCTAACACATGCAAAGTCGAGCGGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGAT TCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCTGGTAGTGGGGGA TAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGCTCTGAGGGAGAAAGTG GGGGATCTTCGGACCTACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT TGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGA TGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACTCTACGGGAGGCGAG CAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT GTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGC AGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTGGAGCTTACCAAGCAATAAGCACCGGCT AACTTCGTGCCAGACGGCGGTAAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGA ATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAATTC CCCCGGTCAACCTGGGAAGTGCATCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGT AGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAG GAACACCACTGGCGAAGGCGACCACTGGAGTACTGACTGACACTGAGGTGC GAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGGTAA ACGATGTCACTAGCGGTGGGATCTTGGAGATCTAGTGGCGAGCTAACG CGATAAGTCGACCGCTGGGAGTACGGCGCGAAGGTTAAACTCAATGA ATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCA CCGAAGAACCTTACCTGGCTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGAT TGTGCTCTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTC</p>	<p>> 252 TTCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAG CGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATG CCTAGGAATCTGCTGCTGAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAA TACCGCATACGCTCTGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTCGGACCTCAGCTA TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAA GGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAAGT AGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGGAATATTGAGCA TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGA TTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTG TTTGGAGCTTACCAACAGAAATAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCG CGGTAAACGAAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG CGCGTAGGTGGTTGAGCAAGTTGGATGTGAATCCCCGGGCTCAACCTGGG AACTGCATCCAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTT CCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCACTGGCGAA GGCGACCACTGGAGTACTGACTGAGTACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGTGACTAGC CGTTGGGATCTTGGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCG CCTGGGGAGTACGGCGCAAGGTTAAACTCAATGAATTGACGGGGGCC CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGACCTT</p>

Sumber : Hasil pengujian di Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Serpong, 2010

Format FASTA adalah format berbasis teks untuk mewakili sekuen nukleotida atau sekuen protein, di mana pasangan basa atau asam amino yang diwakili menggunakan kode huruf tunggal. Penamaan dan penjelasan dibedakan dari sekuen yang diletakkan pada baris pertama yang didahului simbol ">".

Sekuen kedua isolat dilakukan perbandingan dengan *database* nukleotida menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) tipe BLASTn secara *on line* melalui situs www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Data yang digunakan sebagai *input* adalah sekuen 16S rRNA dari masing-masing isolat. *Output* program ini adalah tampilan sekuen yang memiliki kemiripan tinggi terhadap *database* (Utama, 2003). Isolat kode 251 dibandingkan *query sequence* sebanyak 112 yang diperoleh dari *database* (GenBank, EMBL, DDBJ, PDB *sequences*) dengan *identity* 99% *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85, kode akses HQ023428.1. Isolat kode 252 terhadap 112 *query sequence identity* 99% *Pseudomonas sp* J16, kode akses EU099381.1. Berdasarkan nomor akses

diperoleh deskripsi dari masing-masing spesies yang memiliki *identity* 99% dengan isolat seperti dalam Tabel 2. Batas nilai pada saat dua protein dikatakan memiliki kemiripan struktur dan *folding* berdasarkan kesamaan sekuen adalah jika nilai % identitasnya minimal 25% dan dengan *E-value* 0,0. Nilai *bits score* di atas 50 menandakan hasil BLASTn *reliable* (Claverie dan Notredame, 2001 dalam Hidayah, 2005). Derajat kesamaan urutan basa gen penyandi 16S rRNA lebih dari 97% bukan spesies baru (Pangastuti, 2006).

Memvalidasi *identity* dilakukan dengan *adjustment* melalui *multiple alignment sequences* (MSA) menggunakan program Clustal W secara *on line* pada situs <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, sehingga dapat diprediksi kesamaan dan *homology*-nya. *Sequence alignment* merupakan metode penataan dua sekuen (DNA/RNA dan asam amino) atau lebih, untuk ditentukan kesamaan dan homologinya (Baxevanis dan Oullette, 2001 dalam Hidayah, 2005) atau disejajarkan posisinya untuk melihat jarak kedekatan antar masing-masing sekuen.

Tabel 2. Hasil BLASTn Isolat Bakteri Kode 251 dan 252

No.	Isolat	Nomor Akses	Deskripsi	Identity	Bits Score	E-value
1.	251	HQ023428.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain MZA-85 Shah,A.A., Hasan,F., Shah,Z., Hameed,A. and Gulzar,M. (Authors) Sequencing of the 16S rRNA for identification of bacterium (Title) Submitted (19-JUL-2010) Microbiology, Quaid-i-Azam University, Islamabad 45320, Pakistan (Jurnal Unpublished)	99%	1684	0,0
2.	252	EU099381.1	<i>Pseudomonas sp.</i> J16 Qiu,J.G. (Authors) Isolation and characterization of sulphonylureas herbicide resistant bacterium (Title) Submitted (15-AUG-2007) College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Tongwei Road 6, Nanjing, Jiangsu 210095, China (Jurnal Unpublished)	99%	1768	0,0

Multiple alignment sequences adalah apabila sekuen yang dilakukan *alignment*

terdiri atas dua atau lebih (Claverie dan Notredame, 2001 dalam Hidayah, 2005).

Multiple alignment sequences untuk isolat kode 251 dan 252 masing-masing dengan sekuen yang diperoleh dari BLASTn

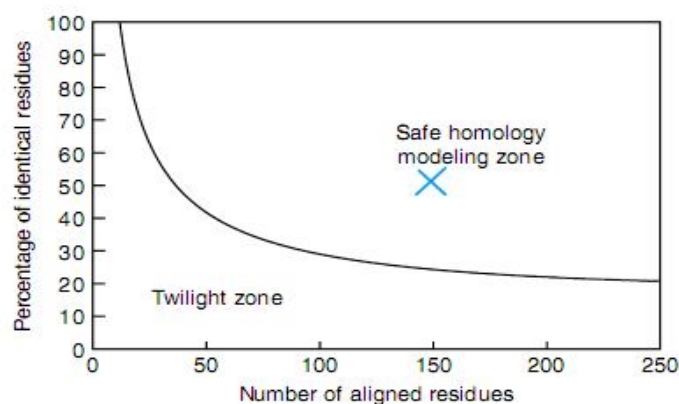
dengan mengambil 5 sekuen dimana hasilnya seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil *Multiple Alignment Sequences* (MSA) Isolat Bakteri Kode 251 dan 252

Seq A	Name	Ln(nt)	Seq B	Name	Ln(nt)	Score
1	251	1016	2	gi 302375270 gb HQ023428.1	1463	99
1	251	1016	3	gi 301322446 gb HM637743.1	1428	99
1	251	1016	4	gi 296034484 gb HM036358.1	1450	99
1	251	1016	5	gi 295808559 emb FN645737.1	1519	99
1	251	1016	6	gi 291062043 gb GU566322.1	1528	99
Seq A	Name	Ln(nt)	Seq B	Name	Ln(nt)	Score
1	252	960	2	gi 156573054 gb EU099381.1	1533	100
1	252	960	3	gi 77415829 emb AM084013.1	1510	100
1	252	960	4	gi 291062043 gb GU566322.1	1536	99
1	252	960	5	gi 289547189 gb GU447238.1	1536	99
1	252	960	6	gi 285206709 gb GU339238.1	1513	99

Hasil *multiple alignment sequences* (MSA) untuk isolat kode 251 tingkat kesamaan dilihat berdasarkan kesamaan identitas antar sekuen dan homologi berdasarkan hubungan sejarah evolusinya dengan sekuen kode akses gi|302375270|gb|HQ023428.1| dari database *GenBank* dengan score 99%. Isolat kode 252 dengan sekuen kode akses gi|156573054|gb|EU099381.1| dari database *GenBank* score 100%. Secara umum bila kandungan DNA homolog berkisar 60-100% dianggap spesies yang sama (Jphnson, 1984 dalam Triana 2005). Besarnya persentasi homologi DNA untuk mengelompokkan bakteri dalam status

spesies dalam *alignment* suatu sekuen sangat dipengaruhi oleh persentase dan panjang panjang asam amino (<http://sciencebiotech.net/membuat-pohon-filogenetik/>). Hasil *alignment* dapat dikatakan aman dan identikal jika berada pada daerah *safe homology modeling zone* (garis silang biru) seperti pada Gambar 1. Berdasarkan deskripsi kedua sekuen yang terdapat dalam *GenBank* memiliki homologi dengan isolat 251 dan 252 keduanya berasal dari benua Asia yaitu gi|302375270|gb|HQ023428.1| dari Pakistan dan gi|156573054|gb|EU099381.1| dari China.

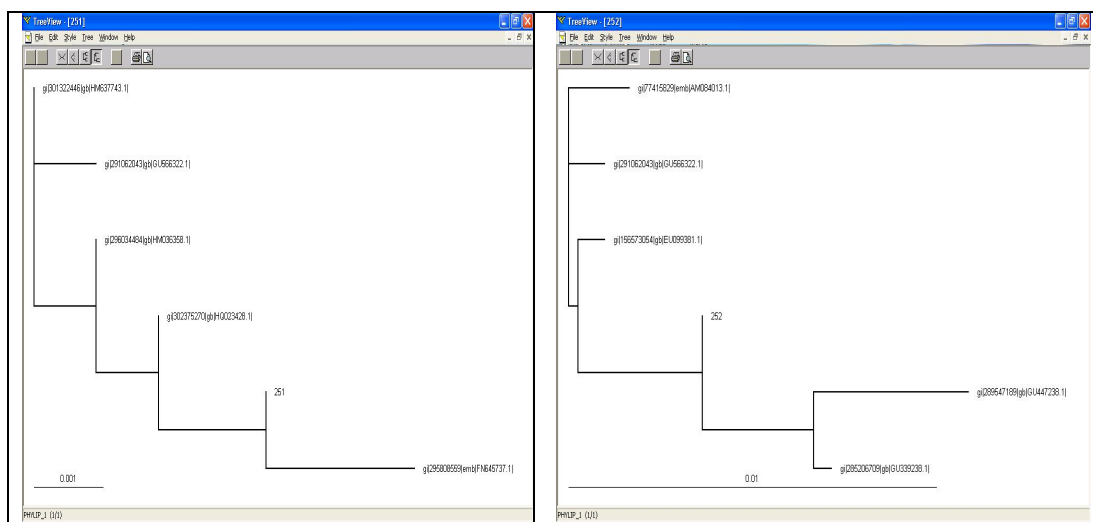


Gambar 1. Dua daerah sekuen *alignment* (Sumber : Krieger, dkk., 2003)

File hasil *multiple alignment sequence* dalam format Clustal W (“.” Dnd) digunakan input untuk visualisasi pohon filogenetik. Visualisasi pohon filogenetik menggunakan program *TreeView* yang diunduh dari situs <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> secara *off line*. Masing-masing isolat diperoleh pohon filogenetik seperti pada Gambar 2. Isolat kode 251 memiliki sekuen yang serupa/terdekat terhadap isolat dengan kode akses [gi|295808559|emb|FN645737.1|](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/295808559) dari database *GenBank* yang merupakan *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA gene isolate 29 (*Isolation of nitrogen-fixing bacteria from different stages of the composting process of cotton crop residues, University of Thessaly, Biochemistry - Biotechnology, Ploutonos*

26 and Aioulou Str., Larisa 41221, GREECE). Evolusi dan kekerabatan isolat kode 251 dari spesies *Pseudomonas aeruginosa*. Isolat kode 252 serupa/terdekat *Pseudomonas sp.* J16, (*Isolation and characterization of sulphonylureas herbicide resistant bacterium, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Tongwei Road 6, Nanjing, Jiangsu 210095, China*) dan memiliki evolusi dan kekerabatan dari *Pseudomonas sp* dan membentuk sub kelompok spesies *Pseudomonas aeruginosa*.

Perbandingan masing-masing isolat pada database di *GenBank* untuk kode 251 memiliki kemampuan *nitrogen-fixing* pada proses *composting cotton*. Isolat kode 252 resisten herbisida



Gambar 2. Hasil Pohon Filogenetik Isolat Menggunakan Program *TreeView*

4. KESIMPULAN

Bakteri yang diperoleh dari isolasi merupakan spesies *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas sp* yang memiliki evolusi dan kekerabatan dengan *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA gene isolate 29 untuk isolat kode 251 dan isolat kode 251 *Pseudomonas sp.* J16. Kedua spesies berdasarkan deskripsi dari database *GenBank* masing-masing mempunyai kemampuan *nitrogen-fixing* pada proses *composting cotton* dan resisten herbisida.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahalya, N., T.V. Ramachandra., and R.D. Kanamadi., 2003, Biosorption of Heavy Metals, *Res.J.Chem. Environ.*, 7(4) Des.
- Anonim,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, 07 September 2010.
- Anonim,
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, 21 September 2010.

- Hidayah, Z., 2005, *Studi Awal Bioinformatika dalam Perancangan Vaksin Dengue Tetravalen*, Skripsi Sarjana (S-1), Departemen Kimia, FMIPA Universitas Indonesia
- Mount, D.W., 2004, *Bioinformatic :sequence and genome analysis*, second edition, CHSL Press New York.
- Munifah, I., B. Saksono dan E. Chasanah, *Studi Bioinformatika Mikroba Streptomyces Penyandi Gen TGase Penghasil Enzim Transglutaminase*, <http://www.bbrp2b.dkp.go.id/.../17.%20STUDI%20BIOINFORMATIKA%20MIKROBA%20Streptomyces%20>, 16 Sep-tember 2010.
- Page, R.D.M., 1996, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, 21 September 2010.
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S., 2008, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press, cetakan 2008, Jakarta.
- Purwoko, T., 2007, *Fisiologi Mikroba*, Cetakan Pertama, PT. Bumi Aksara, Jakarta.
- Pangastuti, A., 2006, Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein, *Biodiversitas*, No. 3 (7).
- Reddy, D. M., D. Paul, H.K. Reddy, G. Reddy, 2009, Characterization and Identification of *Bacillus cereus* GMHS : An Efficient 2-picoline Degrading Bacterium, *International Journal of Integrative Biology*, No. 3 (5).
- Santoso, D., 2001, Pengembangan pelacak DNA spesifik gen melalui bioinformatika: Identifikasi gen penyandi protein biji 21 kDa pada kakao UAH Indonesia, *Menara Perkebunan*, 69 (1), 10-17.
- Triana, E., 2005, Analisis Filogenetik *Rhizobia* yang Diisolasi dari *Aeschynomene* spp, *Biodiversitas*, 6 (4), hal 233-237.
- Utama, A., 2003. *Aplikasi Bioinformatika dalam Virology*, Ilmu Komputer.com.
- Waluyo, L., 2008, *Teknik dan Metode Dasar Mikrobiologi*, Cetakan Pertama, UMM Pres, Malang.
- Witarto, A. B., 2003, *Bioinformatika: Mengawinkan Teknologi Informasi dengan Bioteknologi*, Ilmu Komputer Com.
- Wsuf, M., Y. Hala dan A. Suwanto, 2002, Keragaman Genetika Bakteri Tanah dari Rizosfer Kapas Transgenik dan Nontransgenik di Soppeng, Sulawesi Selatan, *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, September, hal 39-43.
- Yepyhardy, 2010, *Membuat Pohon Filogenetik*, <http://sciencebiotech.net/membuat-pohon-filogenetik/>, 21 September 2010.
- Yuwono, T., 2006, *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*, Edisi Pertama, Penerbit Andi, Yogyakarta.