

Aplikasi Teknik *Environmental DNA* (eDNA) untuk Deteksi Spesies *Cherax quadricarinatus* (Von Martens 1868) Menggunakan Sampel Air

Vella Nurazizah Djalil¹, Achmad Farajallah², Yusli Wardiatno^{3,4*}

¹Program Magister Biosains Hewan FMIPA Institut Pertanian Bogor

²Departemen Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor

³Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan FPIK Institut Pertanian Bogor

⁴Pusat Penelitian Lingkungan Hidup, Institut Pertanian Bogor

Article history

Received: 11 Juli 2018

Revised: 28 Agustus 2018

Accepted: 02 Oktober 2018

Published: 21 November 2018

*Corresponding Author:

Yusli Wardiatno,

Departemen Manajemen
Sumberdaya Perairan FPIK
Institut Pertanian Bogor
Indonesia

Email:

yusli@ipb.ac.id

Abstract: *Cherax quadricarinatus* is an introduced species from Australia. Fast life cycle and high tolerance for the environment cause *C. quadricarinatus* to invade aquatic ecosystems. This study aimed to apply eDNA techniques quickly for the detection of *C. quadricarinatus*. DNA extraction were carried out using precipitation technique. Validation of the presence of *C. quadricarinatus* was carried out using PCR development methods and specific primary designs. The results showed that the presence of *C. quadricarinatus* was detected as much as 60% of all water bodies. Combination of eDNA detection protocol and PCR development method, as well as specific primers designed can be used to detect the presence of *C. quadricarinatus*.

Keywords: *Cherax quadricarinatus*, Environmental DNA, detection, presence, PCR

Abstrak: *Cherax quadricarinatus* merupakan spesies introduksi yang berasal dari Australia. Siklus hidup yang cepat dan toleransi yang tinggi terhadap lingkungan mengakibatkan *C. quadricarinatus* mudah menginvasi ekosistem perairan. Penelitian ini bertujuan untuk mengaplikasikan teknik eDNA secara cepat untuk deteksi *C. quadricarinatus*. Teknik ekstraksi eDNA dilakukan dari sampel air dengan menggunakan teknik pengendapan. Validasi keberadaan *C. quadricarinatus* dilakukan dengan menggunakan metode pengembangan PCR dan desain primer spesifik. Hasil menunjukkan bahwa keberadaan *C. quadricarinatus* terdeteksi sebanyak 60% dari keseluruhan badan perairan. Kombinasi protokol deteksi eDNA dan metode pengembangan PCR, serta primer spesifik yang didesain dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan *C. quadricarinatus*.

Kata kunci : *Cherax quadricarinatus*, Environmental DNA, deteksi, keberadaan, PCR

Pendahuluan

Introduksi spesies ke suatu ekosistem yang baru dapat mengganggu stabilitasnya, berkenaan dengan kompetisi antara spesies introduksi dengan spesies asli, penyakit yang dibawa oleh spesies introduksi, dan perubahan rantai makanan (Horwitz 1990). Persebaran spesies introduksi umumnya

berkaitan dengan kegiatan manusia. Ada dua peluang persebaran spesies introduksi, yaitu secara sengaja (*intentionally introduction*), contohnya perdagangan hewan hias (*ornamental trade*) (Belle *et al.* 2011) dan budidaya, dan ketidaksengajaan (*accidentally introduction*), contohnya *Podarcis siculus* yang terbawa dalam material bangunan dari Eropa menuju ke Amerika Utara (Burke' dan Deichsel 2008). Salah satu spesies introduksi yang

paling luas distribusinya adalah *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *C. quadricarinatus* merupakan lobster air tawar endemik dari Australia bagian Utara dan Papua Nugini (Ruscoe 2002). Menurut FAO *Fisheries Statistics* (2008), budidaya *C. quadricarinatus* terdapat pada negara tropis maupun subtropis, termasuk Indonesia (Edgerton dan Owens 2005). Sebagai hewan budidaya, spesies ini sangat adaptif pada kondisi perairan yang bervariasi (Karplus *et al.* 1998). Siklus hidup *C. quadricarinatus* sangat sederhana dari telur dan lepas ke air kemudian dengan temperatur 20-34°C tumbuh dengan cepat tanpa ada fase perkembangan larva (Jones 1995). Akibatnya, *C. quadricarinatus* tersebar sehingga mudah menginvasi ekosistem perairan (Patoka *et al.* 2016, 2018).

Keberadaan spesies hewan di lingkungan dapat diketahui dengan pengamatan langsung (*direct sign*) dan pengamatan tak langsung (*indirect sign*) (Keeping dan Pelletier 2014). Pengamatan tak langsung (*indirect sign*) dapat diamati melalui jejak-jejak yang ditinggalkan hewan tersebut, salah satunya material genetik (DNA) yang ditinggalkan, yang dikenal dengan *Environmental DNA* (eDNA). Deteksi eDNA adalah teknik yang digunakan untuk memonitoring hewan di perairan (Ficetola *et al.* 2008; Jerde *et al.* 2011). Teknik ini didasarkan pada fakta bahwa semua hewan yang hidup di air meninggalkan DNA melalui kotoran mereka, urine, dan keluapasan kulit (Herder *et al.* 2014). Penggunaan eDNA sudah diterapkan untuk mendeteksi keberadaan amfibi, reptil, ikan, krustasea, burung air, dan mamalia (Goldberg *et al.* 2011; Jerde *et al.* 2011; Olson *et al.* 2012; Biggs *et al.* 2015; Minamoto *et al.* 2015; Wilcox *et al.* 2015). Takahara *et al.* (2012) juga menggunakan deteksi eDNA juga dapat digunakan untuk menghitung biomassa dan kelimpahan ikan (Takahara *et al.* 2012). Dibandingkan teknik sampling secara tradisional, teknik ini dinilai efektif dan efisien dilakukan.

Artikel ini bertujuan untuk mengaplikasikan teknik eDNA secara cepat untuk deteksi *C. quadricarinatus*. Kami mendesain primer spesifik spesies untuk memvalidasi spesifisitas primer dengan menggunakan metode pengembangan PCR.

Bahan dan Metode

Preservasi sampel

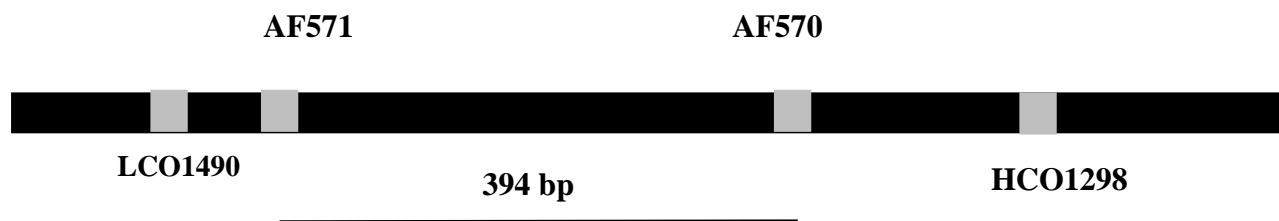
Sampel air diambil dari 35 badan perairan tawar di provinsi Jawa Barat (Tabel 1). Masing-masing lokasi badan perairan dibagi menjadi tiga titik sampling, yaitu bagian inlet (daerah pemasukan air), bagian tengah (daerah antara inlet dan outlet), dan bagian outlet (daerah keluarnya air). Dalam setiap bagian, air diambil beberapa titik menggunakan botol air kemasan yang dibuang isinya. Air dari beberapa botol kemudian disatukan dalam satu botol. Sampel air diawetkan dengan ditambahkan dengan sodium klorida 6M sebanyak 1/10 bagian dan alkohol 96% sebanyak 1/3 bagian. Sampel air dibawa ke laboratorium dalam suhu ruang. Sesampai di lab, disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C. Sebagai kontrol negatif digunakan air mineral kemasan. Sebagai kontrol positif digunakan jaringan otot pada periopod *C. quadricarinatus*.

Ekstraksi DNA

Sampel air disentrifus pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Endapan yang terbentuk selanjutnya dibilas dengan alkohol 70% kemudian diendapkan lagi. Sisa alkohol dalam endapan diuapkan menggunakan *vacuum desiccator*. Endapan yang diperoleh ditambahkan *elution buffer* (Thermo Fisher Scientific Inc, US) pada masing-masing sampel. Ekstraksi sampel berupa jaringan periopod *C. quadricarinatus* dilakukan dengan menggunakan Tissue/Blood DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasi pertama menggunakan primer universal yang dibuat oleh Folmer *et al.* (1994), yaitu *forward* LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3') dan *reverse* HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') dengan suhu *annealing* 45°C. Amplikon kemudian dijadikan cetakan dalam amplifikasi kedua menggunakan primer spesifik CO1 *C. quadricarinatus*, yaitu *forward* AF571 (5'-CAATCACAAATTGGGGGTTTT-3') dan *reverse* AF570 (5'-GCTAGAACGGGGAGGGATAA-3'). Primer spesifik ini didesain menggunakan piranti lunak Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) berdasarkan sekuen utuh CO1 dari *C. quadricarinatus* (Gambar 1).



Gambar 1 Skema posisi penempelan amplifikasi pertama (Folmer *et al.* 1994) dan amplifikasi kedua (AF571 dan AF570)

Visualisasi produk PCR
 Produk PCR dielektroforesis menggunakan agarose gel 1,2% dan divisualisasi dengan menggunakan *UV transluminator* (Sambrook *et*

*al.*2001). Target panjang ukuran amplifikasi pertama adalah 710 pasang basa dan amplifikasi kedua adalah 394 pasang basa.

Tabel 1 Daftar lokasi sampel air yang digunakan untuk mendeteksi *C.quadricarinatus*

| Badan Perairan | Waktu Sampling | Kabupaten/Kota | Kode Sampel |
|-----------------------|----------------|----------------|-------------|
| Situ Gede Bogor | 15.07.2017 | Bogor | SG |
| Situ Leutik | 17.07.2017 | Bogor | LSI |
| Situ Kemang | 18.12.2017 | Bogor | SKA |
| Situ Jampang | 18.12.2017 | Bogor | SJM |
| Situ Cicagu | 18.12.2017 | Bogor | SCG |
| Situ Borcess | 18.12.2017 | Bogor | SBR |
| Danau Dora | 26.11.2017 | Cibinong | DD |
| Situ Cikaret | 26.11.2017 | Cibinong | SCK |
| Situ Cibinong | 13.01.2018 | Cibinong | SCI |
| Situ Citayam | 13.01.2018 | Citayam | SCT |
| Situ Bentenan | 13.01.2018 | Cibinong | SBT |
| Situ Jatijajar | 13.01.2018 | Depok | SJJ |
| Situ Cilodong | 13.01.2018 | Depok | SCL |
| Situ Rawa Besar | 13.01.2018 | Depok | SRB |
| Situ Gede Bekasi | 21.01.2018 | Bekasi | SGB |
| Danau Cibeureum | 21.01.2018 | Bekasi | DCB |
| Danau Resinda | 22.01.2018 | Karawang | DR |
| Situ Kamojing | 01.02.2018 | Karawang | SKJ |
| Waduk Jatiluhur | 06.12.2017 | Purwakarta | WJ |
| Situ Cipanten | 01.02.2018 | Majalengka | SCP |
| Situ Cikuda | 01.02.2018 | Majalengka | SCD |
| Waduk Jatigede | 01.02.2018 | Sumedang | WJG |
| Waduk Dharma | 17.08.2017 | Kuningan | WD |
| Telaga Remis | 01.02.2018 | Kuningan | TR |
| Situ Gede Tasikmalaya | 05.12.2017 | Tasikmalaya | SGT |
| Situ Bojong | 05.12.2017 | Tasikmalaya | SBO |
| Situ Cibeureum | 05.12.2017 | Tasikmalaya | SCM |
| Situ Bagendit | 17.08.2017 | Garut | SB |
| Situ Lengkong | 17.08.2017 | Ciamis | SP |

| Badan Perairan | Waktu Sampling | Kabupaten/Kota | Kode Sampel |
|-----------------|----------------|----------------|-------------|
| Situ Cisanti | 18.08.2017 | Pengalengan | SC |
| Situ Ciburuy | 05.12.2017 | Padalarang | SCB |
| Situ Patenggang | 06.12.2017 | Bandung | SPT |
| Situ Cileunca | 18.08.2017 | Bandung | SCC |
| Waduk Cirata | 06.12.2017 | Cianjur | WC |
| Danau Lido | 11.05.2017 | Sukabumi | LD |

Hasil dan Pembahasan

Keberadaan *C. quadricarinatus* berhasil dideteksi sebanyak 60% dari keseluruhan badan perairan dengan menggunakan teknik eDNA (Tabel 1). Ficaretola *et al.* (2008) mengemukakan bahwa teknik ini adalah teknik yang menjanjikan dalam ekologi. Menurut Biggs *et al.* (2014) tingkat akurasi deteksi spesies menggunakan teknologi eDNA untuk amfibi mencapai 99,3%. Akurasi deteksi ini jauh lebih besar dibanding metode perangkap (76%), survei langsung keberadaan individu (75%) ataupun survei telur (44%).

Pemulihan DNA selular dan ekstraselular dalam air dapat dilakukan dengan teknik pengendapan alkohol maupun teknik filtrasi penyaringan (Deiner *et al.* 2015). Kedua teknik mempunyai kemampuan yang sama dalam mendeteksi ada tidaknya spesies. Teknik pengendapan menggunakan alkohol jauh lebih murah dibandingkan filtrasi. Kendala utamanya adalah pada transportasi sampel air dari situs sampling ke laboratorium. Sebaliknya, teknik filtrasi jauh lebih mahal tetapi mudah ditransportasikan. Kendala lain dari teknik pengendapan adalah jumlah DNA total yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan metode filtrasi (Deiner *et al.* 2015).

Ketika jumlah DNA total yang didapat rendah, maka perlu dilakukan peningkatan kepekaan dengan menambah sampel air yang diendapkan atau filtrasi, dan meningkatkan sampel DNA dalam

terhadap uji PCR untuk mengetahui sensitivitas (Deiner *et al.* 2015). Pada penelitian ini, aplikasi PCR yang dikembangkan adalah primer universal menggunakan suhu *annealing* yang rendah (47°C) yang kemudian amplikonnya dijadikan cetakan untuk diamplifikasi menggunakan primer spesifik spesies target.

Berdasarkan Tabel 2, pada 1st PCR menggunakan primer universal (Folmer *et al.*, 1994) menghasilkan pita amplikon yang tidak tunggal atau tidak spesifik hanya spesies target. Setelah amplikon 1st PCR tersebut dijadikan cetakan dalam 2nd PCR menggunakan primer yang spesifik maka terjadi seleksi terhadap amplikon awal sehingga hanya spesies target saja yang berhasil diamplifikasi. PCR standar tidak cukup sensitif untuk mendeteksi target spesies dengan akurat dari sampel eDNA (Calsamiglia *et al.* 1999). Hal tersebut dikarenakan pada 1st PCR, membutuhkan suhu *annealing* (penempelan primer) yang lebih rendah, sehingga oligonukleotida kurang spesifik berikatan DNA cetakan (*template*) (Wu *et al.* 1991). Pada 2nd PCR membutuhkan suhu *annealing* (penempelan primer) yang lebih tinggi, sehingga oligonukleotida lebih spesifik berikatan DNA cetakan (*template*) (Wu *et al.* 1991).

Kombinasi protokol eDNA dan aplikasi PCR menggunakan primer DNA yang didesain secara spesifik mampu mendeteksi keberadaan spesies di suatu perairan jauh lebih baik dibanding metode deteksi keberadaan secara konvensional (*bioassessment conventional*) (Lim *et al.* 2016).

Tabel 2 Deteksi *C. quadricarinatus* menggunakan PCR (1st PCR = amplifikasi pertama, dan 2nd PCR = amplifikasi kedua)

| Lokasi | Inlet | | Tengah | | Outlet | | Sampel air yang terdeteksi |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------------------|
| | 1st PCR | 2nd PCR | 1st PCR | 2nd PCR | 1st PCR | 2nd PCR | |
| Situ Gede Bogor | + | + | + | + | - | - | ✓ |
| Situ Leutik/LSI | + | + | + | - | - | - | ✓ |
| Situ Kemang | + | - | - | - | + | - | |

| Lokasi | Inlet | | Tengah | | Outlet | | Sampel air yang terdeteksi |
|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------------------|
| | 1st PCR | 2nd PCR | 1st PCR | 2nd PCR | 1st PCR | 2nd PCR | |
| Situ Jampang | + | - | - | - | + | - | |
| Situ Cicagu | - | - | + | - | + | + | ✓ |
| Situ Borcess | + | - | + | - | + | - | |
| Danau Dora | + | - | + | + | + | - | ✓ |
| Situ Cikaret | + | + | + | + | + | - | ✓ |
| Situ Cibirong | + | + | + | - | - | - | ✓ |
| Situ Citayam | + | - | + | + | + | + | ✓ |
| Situ Bentenan | + | - | - | - | - | - | |
| Situ Jatijajar | + | - | - | - | + | - | |
| Situ Cilodong | + | - | - | - | + | + | |
| Situ Rawa Besar | + | + | + | - | - | - | ✓ |
| Situ Gede Bekasi | - | - | - | - | + | - | |
| Danau Cibeureum | - | - | - | - | - | - | |
| Danau Resinda | + | + | + | - | + | - | ✓ |
| Situ Kamojing | - | - | - | - | + | + | ✓ |
| Waduk Jatiluhur | - | - | + | - | + | + | ✓ |
| Situ Cipanten | + | + | - | - | + | + | ✓ |
| Situ Cikuda | + | - | + | + | + | + | ✓ |
| Waduk Jatigede | - | - | - | - | + | - | |
| Waduk Dharma | + | - | + | - | + | + | ✓ |
| Telaga Remis | + | + | + | + | + | - | ✓ |
| Situ Gede Tasikmalaya | - | - | + | - | - | - | |
| Situ Bojong | + | - | - | - | + | - | |
| Situ Cibeureum | + | - | - | - | + | - | |
| Situ Bagendit | + | + | + | - | + | + | ✓ |
| Situ Lengkong Panjalu | + | - | + | + | - | - | ✓ |
| Situ Cisanti | - | - | - | - | + | - | |
| Situ Ciburuy | + | - | + | + | - | - | ✓ |
| Situ Patenggang | + | + | + | - | - | - | ✓ |
| Situ Cileunca | + | + | + | + | + | - | ✓ |
| Waduk Cirata | + | - | - | - | + | - | |
| Danau Lido | + | + | + | + | + | + | ✓ |

Kesimpulan

Dari hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa keberadaan *C.quadricarinatus* terdeteksi sebanyak 60% dari keseluruhan badan perairan. Kombinasi protokol deteksi eDNA dan metode pengembangan PCR, serta primer spesifik yang didesain dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan *C. quadricarinatus*.

Daftar Pustaka

- Belle, C.C; Jason, Q.H.W; Yeo, D, C,J ; Tan, S.H; Heok, H.T; Clews, E dan Peter, A. T. 2011. Ornamental trade as a pathway for Australian redclaw crayfish introduction and establishment. *Aquat Biol* 12: 69-79.
- Biggs, J; Ewald, N; Valentini,A; Gaboriaud, C; Dejean, T; Griffiths, R.A; Foster, J; Wilkinson, J.W; Arnell, A; Brotherton, P;

- Williams, P dan Dunn, F. 2014. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183: 19-28.
- Burke, R.L; Goldberg, S.R; Bursey, C.R; Perkins, S.L dan Andreas, P.T. 2007. Depauperate Parasite Faunas in Introduced Populations of *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) Lizards in North America. *Journal of Herpetology* 41 (4):755-757.
- Calsamiglia, M; Pijoan, C dan Trigo A. 1999. Application of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay to Detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from Nasal Swabs. *J Vet Diagn Invest* 11: 246-251.
- Deiner, K; Walser, J.C; Mächler, E dan Altermatt, F. 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation* 183: 53-63.
- Edgerton, B.F dan Owens, L. 1999. Histopathological surveys of the redclaw freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Australia. *Aquaculture* 180: 23-40.
- Ficetola, G.F; Miaud, C; Pompanon, F dan Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4: 423-425.
- Folmer, O; Black, M; Hoeh, W; Lutz, R dan Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Goldberg, C.S; Pilliod, D.S; Arkle, R.S dan Waits, L.P. 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PloS One* 6, e22746.
- Herder, J.E. A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. van Delft, P.F. Thomsen dan P. Taberlet, 2014. Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104.
- Horwitz, P. 1990. The Translocation of Freshwater Crayfish in Australia: Potential Impact, TheNeed for Control and Global Relevance. *Bio Con* 54: 291-305.
- Jerde, C.L; Mahon, A.L; Chadderton, W.L dan Lodge, D.M. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4: 150-157.
- Jones, C.M. 1995. Effect of temperature on growth and survival of the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae). *Freshwater Crayfish* 8: 391-398.
- Karplus, I; Zoran, M; Milstein, A; Harpaz, S; Eran, Y; Joseph, D dan Sagi, A. 1998. Culture of the Australian red-claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel. III. Survival in earthen ponds under ambient winter temperatures. *Aquaculture* 166: 259-267.
- Keeping D dan Pelletier, R. 2014. Animal density and track counts: understanding the nature of observations based on animal movements. *PLoS One* : 9(5) : e96598.
- Lim, N.K.M; Tay, Y.C; Srivathsan, A; Tan, J.W.T; Kwik, J.T.B; Balouglu, B; Meier, R dan Ye, D.C.J. 2016. Next-generation freshwater bioassessment: eDNA metabarcoding with a conserved metazoan primer reveals species-rich and reservoir-specific communities. *R. Soc. Open Sci.* 3: 160635.
- Lin T, Liu, F dan Liao, I. 1999. Experiment on adaptation of Australian crayfish to selected environmental factors. *J Taiwan Fish Res* 7: 73-85.
- Minamoto, T; Yamanaka, H, Takahara, T; Honjo, M. N dan Kawabata, Z. 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13:193-197
- Olson, Z.H.; Briggler, J.T dan Williams, R.N. 2012. An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildl. Res.* 39: 629-636.
- Patoka, J.; Wardiatno, Y.; Yonvitner; Kuřiková, P.; Petřtýl, M dan Kalous, L. 2016. *Cherax quadricarinatus* (von Martens) has invaded Indonesian territory west of the Wallace Line: evidences from Java. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 417: 39.

- Patoka, J.; Wardiatno, Y.; Mashar, A.; Yonvitner; Wowor, D.; Jerikho, R.; Takdir, M.; Purnamasari, L.; Petrýl, M.; Kalous, L; Kouba, A. dan Bláha, M. 2016. Redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868), widespread throughout Indonesia. *BioInvasions Records* 7(2): 185-189.
- Ruscoe, I. 2002. *Fishnote 2 : Redclaw Crayfish Aquaculture*. Australia : Darwin Fisheries Northern Territory Government.
- Takahara, T., Minamoto, T. dan Doi, H., 2013. Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLoS One* 8, e56584.
- Wilcox, T.M; McKelvey, K.S; Young, M.K; Jane, S.F; Low,e, W.H; Whiteley, A.R dan Schwartz, M. K. 2013. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS One* 8 (3): e59520
- Wu, D.Y; Ugozzoli, L; Pal, B.K; Qian, J dan Wallace, R.B. 1991. The effect of emperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol.* 10(3): 233-238.