

ARTICLE

EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM ENDONUKLEASE RESTRIKSI KASAR DARI BAKTERI *Escherichia coli*

[*Extraction and Characterization of Crude Restriction Endonuclease Enzymes from Escherichia coli Bacteria*]

Lukas Pardosi*, Sonya Yuniarsi Tode, Gergonius Fallo

Program Studi Biologi Fakultas Pertanian, Sains dan Kesehatan Universitas Timor

Jalan km 9, Kelurahan Sasi, Kecamatan Kota Kefamenanu, Kabupaten Timor Tengah Utara, Provinsi Nusa Tenggara Timur

ABSTRAK

Enzim Endonuklease diisolasi dari beberapa jenis bakteri termasuk *Escherichia coli*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik enzim endonuklease restriksi kasar dari bakteri *E. coli* yang dipengaruhi kondisi suhu dan pH. *E. coli* diisolasi dari sampel air sumur dan ditumbuhkan pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). Isolat bakteri *E. coli* digunakan dalam pengukuran kurva pertumbuhan untuk mengetahui fase pertumbuhan bakteri serta mendapatkan waktu yang optimum untuk memproduksi ekstrak kasar enzim endonuklease. Proses produksi enzim endonuklease dengan metode sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C dan diulang 4 kali. Hasil sentrifugasi dikarakterisasi dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhannya berbeda-beda yaitu, (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%) dan diukur aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Hasil fraksinasi yang aktivitasnya paling optimum pada fraksi 0-20%. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas enzim dengan variasi suhu dan Ph menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Hasilnya pada variasi suhu aktivitas enzim paling optimum terjadi pada suhu 37°C, sedangkan pada variasi pH aktivitas optimum enzim terjadi pada pH 7.

Kata Kunci: *Escherichia coli*, Enzim endonuklease, pH, suhu

ABSTRACT

Endonuclease enzymes are isolated from several types of bacteria including Escherichia coli. The purpose of this study was to determine the characteristics of coarse restriction endonuclease enzymes from E. coli bacteria that are influenced by temperature and pH conditions. E. coli was isolated from well water samples and grown on Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) media. Isolates of E. coli bacteria are used in growth curve measurements to determine the phase of bacterial growth and obtain optimal time to produce crude extracts of endonuclease enzymes. The process of endonuclease enzyme production by centrifugation method at a speed of 10000 rpm for 30 minutes at 4°C and repeated 4 times. Centrifugation results are characterized by fractionation using ammonium sulfate with different saturation levels, namely (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%) and measured enzyme activity using a spectrophotometer at a wavelength of 600 nm. Fractionation results whose activity is most optimal at fractions of 0-20%. Furthermore, enzyme activity testing with temperature and pH variations was carried out using a spectrophotometer with a wavelength of 600 nm. The result is that at temperature variations the most optimal enzyme activity occurs at 37°C, while at pH variations the optimum activity of enzymes occurs at pH 7.

Keywords: *Escherichia coli*, enzymes endonuclease, pH, temperature

PENDAHULUAN

Enzim restriksi merupakan enzim yang bekerja sebagai "gunting molekul" yang krusial, memotong DNA pada posisi yang sesuai dengan urutan tertentu. Enzim restriksi yang dihasilkan oleh bakteri disebut sebagai endonuklease yang biasanya memiliki kemampuan untuk mengenali urutan nukleotida yang spesifik sepanjang 4 hingga 8 pasangan basa. Urutan nukleotida yang spesifik ini disebut sebagai situs restriksi, yang umumnya merupakan sekuens palindromik (Howe, 2007; Lodish *et al.*, 2003, Ream *et al.*, 2003).

Menurut Campbell *et al.*, (2004), Enzim endonuklease adalah salah satu enzim dari enzim hidrolisis lainnya yang terdapat di dalam lisosom. Endonuklease bekerja untuk memotong-motong DNA (*Deoxy Ribonucleic Acid*) pada urutan nukleotida tertentu (Yatim, 2003). Enzim endonuklease restriksi dapat dihasilkan oleh bakteri.

Enzim endonuklease restriksi yang dihasilkan oleh jenis bakteri yang berbeda mempunyai karakteristik yang khas. Indonesia yang kaya akan jenis mikroorganisme sangat berpotensi dalam menghasilkan berbagai jenis enzim restriksi, yang mungkin tidak ditemukan ditempat lain. Salah satu contoh adalah bakteri fotosintetik MW5 asal Indonesia yang diketahui mengandung enzim restriksi (Juliana 1996). Dalam aktivitasnya, enzim endonuklease membutuhkan kondisi tertentu untuk menghasilkan pemotongan yang optimal. Kondisi yang dimaksud ialah suhu, pH, kekuatan ion (Davis *et al.*, 1986), selain daripada itu ada juga faktor-faktor lain yang berhubungan dengan kondisi-kondisi reaksi seperti kemurnian DNA, dan keadaan enzim itu sendiri yang dapat mempengaruhi aktivitasnya.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu tube sentrifuse (merk Eppendorf), tips, pipet mikro (merk Eppendorf 1000 μ L), shaker (merk DLAB), timbangan digital (olympus), pH meter, outoklaf (merk GEA), vorteks (Thermo Scientific 8888), spektrofotometer (merk Innova), sentrifuse (Thermo Scientific Bt 29 A), lampu Bunsen, *hot plate* (merk Thermo Scientific), dan alat-alat gelas (merk Iwaki).

Media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) (merk Himedia), *Nutrien Broth* (NB) (merk Himedia), buffer asetat (merk Himedia), aquades, NaCl (merk Merck), Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (merk Merck), plastik sill, aluminium foil, kertas label, es, aquabides, buffer dan air keran untuk isolasi bakteri *Escherichia coli*.

Isolasi bakteri *Escherichia coli*

Isolasi bakteri dilakukan dengan mengambil sampel air dari sumur gali di Fakultas Pertanian Universitas Timor, Kefamenanu secara aseptik. Sampel sebanyak 0,1 ml ditumbuhkan dalam cawan petri dengan media EMBA, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 (tiga) hari. Pada hari ke-3 jika ditemukan koloni berwarna hijau metalik yang tumbuh, koloni tersebut diduga merupakan *Escherichia coli* (Prawesthirini *et al.*, 2009).

Peremajaan bakteri *Escherichia coli*

Isolat bakteri *Escherichia coli* diremajakan pada media EMBA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menginokulasikan bakteri hasil peremajaan sebanyak 2 ose ke dalam Erlenmeyer yang berisi 250 mL media NB steril dan diinkubasi pada suhu 37°C. Perhitungan kurva pertumbuhan bakteri berdasarkan nilai OD setiap 4 jam menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Pengamatan dimulai dari 0 jam sampai 48 jam.

Produksi enzim endonuklease

Produksi enzim dilakukan dengan tahapan yang sama dengan pengukuran kurva pertumbuhan. Ekstraksi dilakukan dengan preparasi sampel untuk memperoleh ekstrak kasar enzim restriksi. Isolat bakteri yang telah dimurnikan diambil 2-3 ose dan disuspensikan dalam media NB dan dishaker selama 24 jam. Ekstrak kasar enzim dipanen pada waktu optimum berdasarkan waktu optimum dimana bakteri dapat memproduksi enzim. Ekstrak kasar enzim dipisahkan dari pelet bakteri dengan sentrifugasi 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C dan diulang sebanyak 4 kali.

Fraaksinasi ekstrak kasar enzim endonuklease dengan ammonium sulfat

Fraaksinasi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan menambahkan Ammonium Sulfat pada ekstrak kasar enzim secara perlahan dan diaduk dengan magnetic stirrer dalam keadaan dingin hingga larut. Penambahan ammonium sulfat dengan kadar kejenuhan yang berbeda-beda, 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%. Endapan dari masing-masing fraksi disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. endapan hasil sentrifuse dilarutkan dengan buffer fosfat dan diukur aktivitasnya menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

Karakterisasi ekstrak kasar enzim endonuklease

Karakterisasi enzim endonuklease dilakukan dengan membuat variasi suhu dengan menggunakan alat thermo mixer. 27°C, 32°C, 37°C, 42°C, 47°C dan variasi pH buffer asetat (4, 5, 6, 7, 8).

Pengujian aktivitas enzim endonuklease

Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan mereaksikan 1,5 ml enzim restriksi yang diperoleh dengan 0,5 ml buffer asetat kemudian diukur aktivitasnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan dua faktor yakni, variasi suhu (32°C, 37°C, 42°C, 47°C) dan pH (4, 5, 6, 7, 8).

HASIL

Isolasi dan peremajaan bakteri *Escherichia coli*

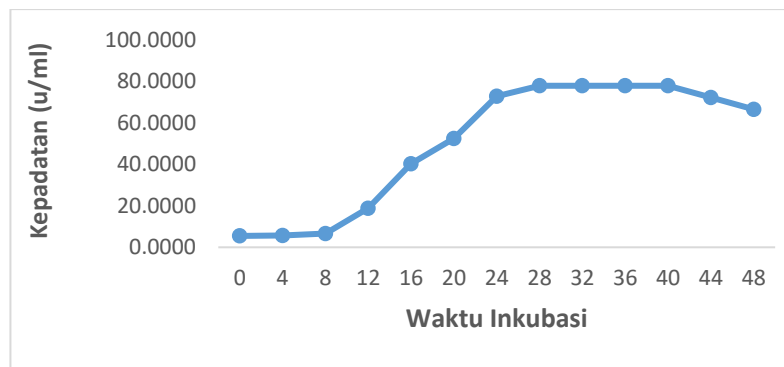
Hasil isolasi bakteri *E.coli* dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* pada media EMBA (*Results of isolation of Escherichia coli bacteria on EMBA media*).

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Hasil pengukuran kurva pertumbuhan bakteri *E. coli* diketahui fase lag terjadi pada jam ke 0-jam ke-8, fase log (eksponensial) terjadi pada jam ke-9-jam ke-24, fase stasioner pada jam ke 25-jam ke-40, fase kematian bakteri pada jam ke 41-jam ke-48. (Gambar 2).



Gambar 2. Diagram kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (*Growth curve diagram of Escherichia coli bacteria*)

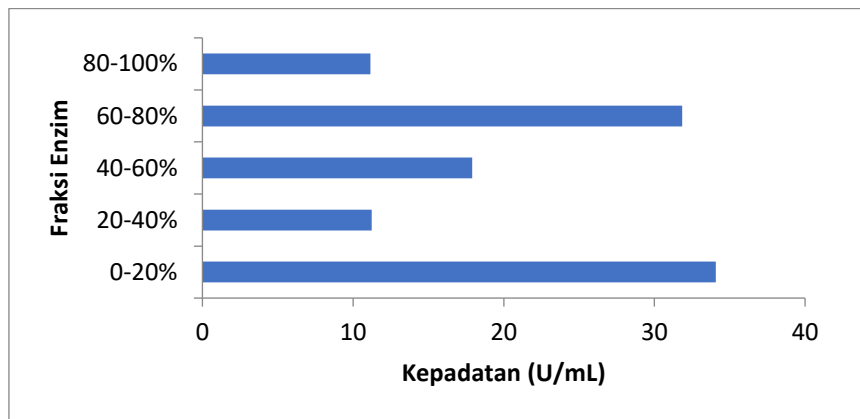
Ekstraksi enzim endonuklease restriksi kasar dan fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat

Ekstraksi enzim endonuklease restriksi kasar dilakukan dengan metode sentrifugasi. Hasil sentrifugasi enzim dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Supernatan dan pelet hasil sentrifugasi (*Supernate and pellets from centrifugation*).

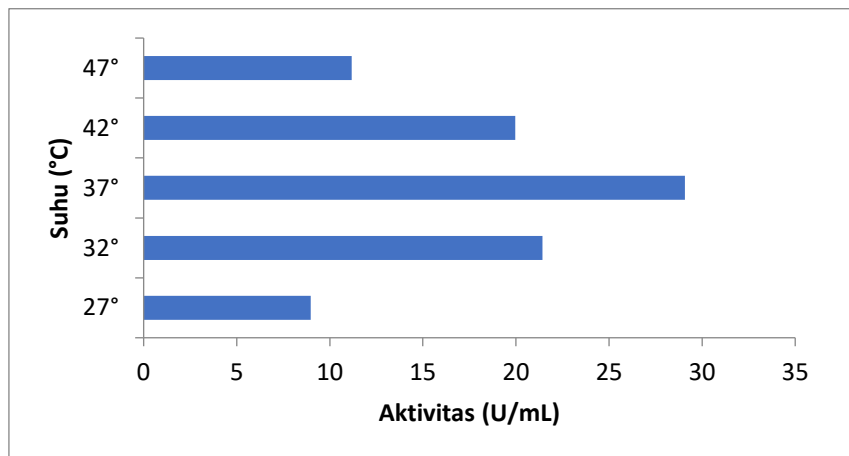
Hasil sentrifugasi (supernatant) selanjutnya digunakan pada tahap fraksinasi enzim. Fraksinasi enzim endonuklease restriksi kasar dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda-beda yaitu, (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%) dan diukur aktivitasnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Hasil pengukuran aktivitas enzim dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 4. Aktivitas enzim endonuklease restriksi kasar hasil fraksinasi dengan ammonium sulfat (*Activity of coarse-restricted endonuclease enzymes as a result of fractionation with ammonium sulfate*).

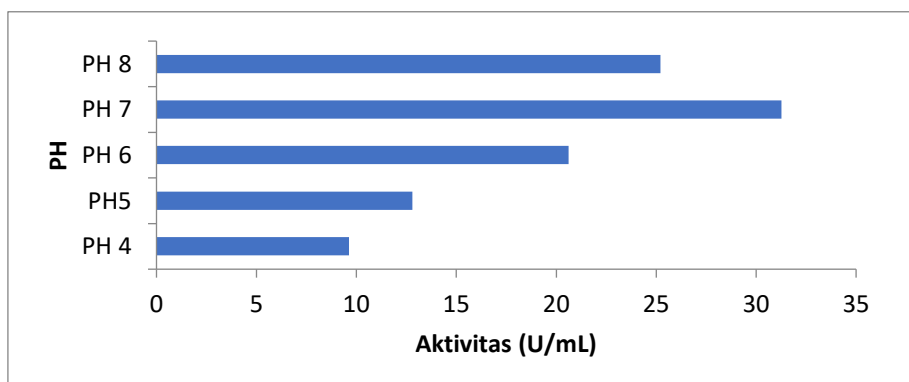
Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim endonuklease

Hasil pengukuran pengaruh suhu terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim endonuklease dapat dilihat pada gambar 5 berikut ini.



Gambar 5. Diagram pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim endonuklease (*Diagram of the influence of temperature on the activity of endonuclease enzymes*).

Hasil pengukuran pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 6. Diagram pengaruh pH terhadap aktivitas enzim endonuklease (*Diagram of the influence of pH on the activity of the enzyme endonuclease*).

PEMBAHASAN

Isolasi dan peremajaan bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif fakultatif anaerob dan mempunyai alat gerak berupa flagel yang tersusun dari subunit protein yang disebut flagelin. Flagelin yang dimiliki mempunyai berat molekul rendah, ukuran diameter 12-18 nm panjang 12 nm, kaku, berdiameter lebih kecil yang tersusun dari protein, pili dapat berfungsi saat pemindahan DNA saat konjugasi. Selain itu mempunyai kapsul atau lapisan lendir yang merupakan polisakarida tebal dan air yang melapisi permukaan luar sel (Ikmalia, 2008).

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Berdasarkan grafik diatas fase lag bakteri terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-8, dengan ditunjukkannya grafik yang belum mengalami peningkatan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Khoiriyah & Ardiningsih (2014) yang menyatakan bahwa pada fase lag bakteri tidak terlalu mengalami peningkatan jumlah sel karena pada fase ini bakteri melakukan proses adaptasi terhadap kondisi lingkungannya seperti pH, suhu, dan nutrisi. Sedangkan pada fase log bakteri mengalami peningkatan jumlah sel yang cukup banyak, sehingga grafik menjadi seperti garis lurus. Hal ini dikarenakan pada fase log (eksponensial) sel mulai membelah secara aktif dan bakteri masuk pada fase pertumbuhan serta pertambahan jumlah sel secara logaritmik. Pada fase log bakteri menjadi lebih aktif dalam memproduksi senyawa metabolit termasuk enzim, dan pada fase ini juga bakteri menjadi lebih sensitif terhadap lingkungan (Jawetz *et al.*, 2008). Pada penelitian ini fase log terjadi pada jam ke-9 sampai jam ke-24, terlihat pada grafik (gambar 2), dimana pertumbuhan bakteri meningkat dengan ditunjukkannya grafik yang meningkat secara drastis.

Fase stasioner dapat dikatakan sebagai periode kesimbangan karena pada fase ini bakteri tidak mengalami pertambahan jumlah sel. Hal ini dikarenakan adanya kekurangan nutrisi, akumulasi produk sisa dan perubahan pH yang bersifat toksik sehingga pertumbuhan eksponensial terhenti (Jawetz *et al.*, 2008). Pada penelitian ini fase stasioner terjadi pada jam ke-25 hingga jam ke-40, ditandai dengan grafik yang membentuk garis lurus. Fase kematian bakteri ditandai dengan berkurangnya jumlah sel hidup dalam media pertumbuhan (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Pada penelitian ini fase kematian bakteri terjadi pada jam ke-44, ditandai dengan menurunnya kurva pada grafik.

Enzim secara efektif diproduksi pada fase eksponensial (log) karena pada fase ini biomassa mikroba mengalami peningkatan dan pada fase ini juga mikroba sangat efektif dalam mensintesis enzim untuk kelangsungan hidupnya (Sulistyaningtyas *et al.*, 2013).

Ekstraksi enzim endonuklease restriksi kasar dan fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu 4°C dapat memisahkan supernatan dan pelet yang dimana supernatan yang dihasilkan akan digunakan pada tahap selanjutnya sedangkan pelet (endapan) dibuang. Menurut Setiawan, 1998 supernatan yang terbentuk mengandung enzim restriksi. Sentrifugasi selalu dilakukan dalam keadaan dingin (4°C) agar enzim tidak terdenaturasi (Irawati, 2016). Hasil sentrifugasi (supernatant) selanjutnya digunakan pada tahap fraksinasi enzim.

Pada fraksi 0-20% aktivitas enzim menjadi optimum. Hal ini sesuai dengan penelitian Su'i *et al.*, 2013 yang menyatakan bahwa pemberian ammonium sulfat hingga tingkat kejenuhan 60% total protein makin rendah, dan protein akan kembali meningkat setelah 60%.

Menurut Bahri *et al.* (2012) dalam mengkarakterisasi enzim dari kecambah biji jagung menggunakan ammonium sulfat yang aktivitas tertinggi pada konsentrasi 55%. Menurut Sriwahyuni *et al.* (2015) yang juga menggunakan ammonium sulfat untuk mengkarakterisasi enzim dari biji buah durian mendapatkan aktivitas tertinggi pada konsentrasi 60%. Pada penelitian ini aktivitas tertinggi terdapat pada konsentrasi 0-20%. Hasil yang berbeda-beda ini dapat terjadi karena disebabkan oleh faktor lingkungan seperti suhu, pH, dan sumber sampel yang berbeda (Wahyuni *et al.*, 2017).

Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim endonuklease

Perubahan suhu memengaruhi aktivitas enzim, termasuk enzim restriksi, karena enzim terdiri dari protein yang merupakan biokatalisator. Suhu dapat memengaruhi struktur protein, yang pada gilirannya mempengaruhi aktivitas enzim tersebut (Fikri *et al.*, 2014). Pada penelitian ini temperature kurang dari 40°C aktivitas enzim cukup stabil, sedangkan pada suhu lebih dari 40°C aktivitas enzim menurun secara drastis, hal ini karena enzim mengalami denaturasi protein yang dapat merusak struktur molekul enzim sehingga kehilangan sifat katalitiknya. Suhu optimum yaitu suhu yang menyebabkan terjadinya reaksi kimia dengan kecepatan paling besar. Bila suhu yang digunakan melebihi suhu optimum (37°C) maka akan terjadi kerusakan struktur enzim (Campbell *et al.*, 2004).

Aktivitas enzim optimal terjadi pada pH tertentu karena sifat dasar protein yang rentan mengalami denaturasi ketika terpapar pH ekstrem (Fikri *et al.*, 2014). Pada pH yang terlalu asam atau basa enzim akan terdenaturasi sehingga sisi aktif enzim dapat terganggu (Safaria *et al.*, 2013). Terjadinya perubahan nilai pH sangat mempengaruhi kerja enzim. Sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim sangat mudah dipengaruhi oleh pH (Pelczar dan Chan, 1986).

KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* dari air sumur memiliki karakter bentuk circular, warna koloni hijau metalik, elevasi berbetuk convex dan tepi koloni entire. Hasil fraksinasi ekstrak kasar enzim endonuklease restriksi kasar terdapat pada fraksi 0-20% dengan aktivitasnya 34.076 u/ml. Suhu yang paling optimum untuk aktivitas enzim endonuclease adalah 37°C dengan nilai aktivitas 29.070 U/ml, sedangkan variasi pH aktivitas optimum enzim terjadi pada pH 7 dengan nilai aktivitas 31.272 U/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada laboratorium Biologi Universitas Timor yang telah mewadahi dalam melaksanakan penelitian ini hingga selesai.

KONTRIBUSI PENULIS

LP: Membuat konsep penelitian, merevisi naskah akhir mengumpulkan data penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir; SYT : mengumpulkan data penelitian; GF: merevisi naskah akhir.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahri, S., Mirzan, M., Hasan, M. 2012, Karakterisasi Enzim Amilase Dari Kecambah Biji Jagung Ketan (*Zea mays ceratina* L.). *Jurnal Natural Science*, 1(1), pp.132-143.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Mitchell, L. G. 2004. Biologi (Jilid 3, Edisi ke-5, Terj. Wasmen Manalu). Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Davis, I.G., M.D. Dibner, dan J.F. Battey. 1986. *Basic Method in Molecular Biology*. Elsevier, New York.
- Fikri, M.Z, Nurhayati, T., Salamah, E. (2014). Ekstraksi Dan karakterisasi parsial ekstrak kasar enzim katepsin Dari ikan patin. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 25(1), pp.119-123.
- Howe, C. 2007. *Gene cloning and manipulation*. Cambridge University Press.
- Ikmalia. (2008). *Analisa profil protein isolat Escherichia coli S1 hasil iradiasi sinar gamma*. Skripsi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Irawati, R. 2016, *Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh Bacillus circulans*. Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. Adelberg, E.A. 2008. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 23. Jakarta : Penerbit Salemba Medika.
- Juliana. 1996. *Telaah Enzim Endonuklease Restriksi dari Rhodobacter sp. Asal Indonesia*. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.

- Khoiriyah, H., Ardiningsih, P. 2014. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus* Sp. Red. *JKK*. 3(4), pp.52-56.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L, Matsudaira, P, Baltimore, D., Darnell, J. 2003. *Molecular cell biology*. 5th ed. New York: W. H. Freeman
- Mangunwidjaja, D., Suryani A. 1994. Teknologi Bioproses. Jakarta : Swadaya.
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan, 1986, Penerjemah Ratna Siri Hadioetomo dkk. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1, Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Prawesthirini, S., H. P. Siswanto, A. T. S. Estoepangestie, M, H. Effendy N. Harijani, G. C. de Vries, Budiarto dan E. K. Sabdoningrum. 2009. Analisa Kualitas Susu, Daging dan Telur. Cetakan Kelima. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ream, W., Field, K. G., Field, K. M. 2003. *Molecular biology techniques: An intensive laboratory course*. Academic Press.
- Safaria, S. Idiawati, N., Zaharah, T.A. 2013. Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus Niger* dan *Trichoderma Reesei* Dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *JKK*, 2(1), pp.46-51.
- Setiawan, B. 1998. *Karakterisasi enzim endonuklease restriksi dari bakteri fotosintetik anoksigenik MW5*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Sriwahyuni, L., Rosahdi, T.D., Supriadin, A. 2015. Isolasi Dan Karakterisasi Amilase Dari Biji Durian (*Durio* Sp.). *Al Kimiya*, 2(10), pp.18-23.
- Su'i. M., Suprihana. (2013). Fraksinasi Enzim Lipase Dari Endosperm Kelapa Dengan Metode Salting Out. *Agritech*, 33(4), pp.377-383.
- Sulistyaningtyas, A.S., Prasetywan, S., Sutrisno. 2013. Pengaruh Penambahan Ion Fe³⁺ Terhadap Aktivitas Xilanase dari *Trichoderma viride*. *Kimia Student Journal* 2(2), pp.470-476.
- Wahyuni S, Suarya, Saputra I. M. A. 2017. Isolasi Enzim Amilase dari Kecambah Biji Jagung Lokal Seraya (*Zea mayz* L.). *Jurnal Kimia*, 11(2), pp.107-193.
- Yatim, Wildan. (2003). *Genetika*. Bandung: Tarsito.