

IDENTIFIKASI MOLEKULER BERBASIS MARKA GEN 16S rRNA TERHADAP BAKTERI COLIFORM TERKULTUR YANG DISOLASI DARI FORAMINIFERA JENIS CALCARINA ASAL PERAIRAN PULAU PRAMUKA, KABUPATEN KEPULAUAN SERIBU, DKI JAKARTA

THE 16S rRNA GENE MARKER-BASED MOLECULAR IDENTIFICATION OF CULTURABLE COLIFORM BACTERIA ISOLATED FROM FORAMINIFERA CALCARINA DERIVED FROM PRAMUKA ISLAND WATERS, THE SERIBU ISLAND DISTRICT, JAKARTA PROVINCE

Mochamad Untung Kurnia Agung¹⁾, Agus Tri Askar¹⁾, Yuli Andriani¹⁾,
Lintang Permatasari Yuliadi¹⁾

¹⁾Departemen Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Sumedang,
Jawa Barat 45363 Indonesia

*Email: mochamad.untung@unpad.ac.id

ABSTRAK

Kontaminasi bakteri *coliform* pada foraminifera benthik telah dilaporkan terjadi akibat pencemaran limbah organik pada lingkungan perairan di sekitar ekosistem terumbu karang dan kejadian ini diketahui dapat mengganggu proses pembentukan cangkang foraminifera yang pada akhirnya berakibat pada terganggunya peran foraminifera dalam proses pembentukan sedimen dasar terumbu karang. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi secara molekuler isolat bakteri *coliform* terkultur yang mengkontaminasi foraminifera jenis *Calcarina* yang disolasi dari perairan Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta dengan menggunakan marka gen 16S rRNA. Pengambilan sampel foraminifera dilakukan di perairan Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta pada 5(lima) stasiun, sementara proses isolasi bakteri dan identifikasi molekuler dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Molekuler (MICROMOL), Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK), Universitas Padjadjaran. Identifikasi molekuler dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berbasis marka gen 16S rRNA. Sekuensing dilakukan dengan mengirim amplicon hasil PCR ke perusahaan jasa sekuensing 1st Base di Singapura dan proses pencocokan hasil sekuensing dengan database di genBank dilakukan dengan bantuan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTTM) yang tersedia di website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Hasil amplifikasi gen 16S rRNA dari kelima isolat menghasilkan amplicon dengan panjang ± 1400 bp dengan konsentrasi berkisar antara 157,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan dengan rasio kemurnian berkisar antara 1,477-1,769. Sementara hasil BLAST dan analisis filogenetik menunjukkan bahwa kelima isolat memiliki kekerabatan erat dengan isolat bakteri *Eschericia coli* strain *inspire99* (Acc No. JQ315935.1), yang diisolasi dari perairan Teluk Benggala, India. Hasil ini juga menunjukkan adanya konektivitas ekologi antara perairan Teluk Benggala di India dengan perairan Pulau Pramuka di Indonesia.

Kata Kunci : *coliform*, foraminifera, 16S rRNA, konektivitas ekologi

ABSTRACT

Contamination of *coliform* bacteria in benthic foraminifera has been reported due to pollution of organic wastes in the aquatic environment around coral reef ecosystems and this event was known to interfere the

process of foraminifera shell formation which in turn resulted the disruption of the role of foraminifera in the process of formation of coral reef bottom sediments. The aim of this research is to identify the isolates of culturable *coliform* bacteria that contaminate foraminifera *Calcarina* species isolated from the waters of the Pramuka Island, the Seribu Island district, Jakarta Province using the 16S rRNA gene markers. Foraminifera sampling was carried out in the waters of Pramuka Island, the Seribu Island district, Jakarta Province in 5 (five) stations, while the process of bacterial isolation and molecular identification were carried out at the Laboratory of Microbiology and Molecular Biotechnology (MICROMOL), Faculty of Fisheries and Marine Sciences (FPIK), University Padjadjaran. Molecular identification was carried out using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method based on the 16S rRNA gene markers. Sequencing is done by sending PCR results to 1st Base, sequencing service company, in Singapore and then, the aligning of sequencing results with databases in genBank was done using the *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST™) program available on the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) website. The results of 16S rRNA gene amplification from the five isolates produced amplicons of \pm 1400 bp length with concentrations ranging from 157.5 μ g / mL-230 μ g / mL and with a purity ratio ranging from 1.477-1.769. While the results of BLAST and phylogenetic analysis showed that the five isolates were closely related to the isolate *Escherichia coli* strain *inspire99* (Acc No. JQ315935.1), which was isolated from the waters of the Bay of Bengal, India. These results also indicate the existence of ecological connectivity between the waters of the Bay of Bengal in India and the waters of Pramuka Island in Indonesia.

Keywords : *coliform*, foraminifera, 16S rRNA, ecological connectivity

PENDAHULUAN

Foraminifera merupakan mikrobiota laut yang diketahui berperan dalam proses pembentukan terumbu karang. Beberapa jenis foraminifera benthik diketahui telah membantu pembentukan sekitar 30% dari total hamparan terumbu karang di kawasan *Great Barrier Reef*, Australia (Yamano *et al.*, 2000). Dalam penelitian mikropaleontologi, foraminifera dapat dijadikan indikator dalam penentuan umur lapisan batuan sedimen serta sebagai penentuan kondisi lingkungan (Pringgoprawiro dan Kapid, 2000). Selain berasosiasi dengan terumbu karang, foraminifera juga dapat berasosiasi dengan alga atau diatom (Talge and Hallock, 1995) dan bakteri (van Bruggen *et al.*, 1983) yang dapat ditemukan baik pada foraminifera besar (Richardson and Rutzler, 1999) maupun foraminifera kecil (Bernhard, 2006).

Perubahan kondisi lingkungan perairan dapat menyebabkan gangguan pada foraminifera, termasuk kontaminasi yang disebabkan oleh aktivitas bakteri (Dewi dan Darlan, 2008). Pertumbuhan populasi bakteri pada suatu perairan dapat dipicu oleh adanya aktivitas buangan limbah organik ke perairan, yang dapat juga menyebabkan meningkatnya populasi bakteri patogen. Keberadaan bakteri patogen tersebut dapat menyebabkan terganggunya metabolisme foraminifera dalam pembentukan cangkang. Prazeres *et al.* (2017) berhasil mengidentifikasi keberadaan bakteri *coliform* dari kelompok *firmicutes* dan *bacteroides* pada foraminifera jenis *Amphistegina lobifera*.

Bakteri *coliform* merupakan kelompok bakteri yang dapat dijadikan sebagai bioindikator terjadinya pencemaran limbah organik di suatu perairan. Keberadaan bakteri *coliform* pada suatu lingkungan perairan juga dapat meningkatkan jumlah

populasi bakteri patogen seperti *vibrio*, *salmonella*, dan *shigella* yang dapat menginfeksi dan mengganggu proses pembentukan cangkang foraminifera dan pada akhirnya dapat berpengaruh terhadap aktivitas pembentukan terumbu karang di kawasan tersebut.

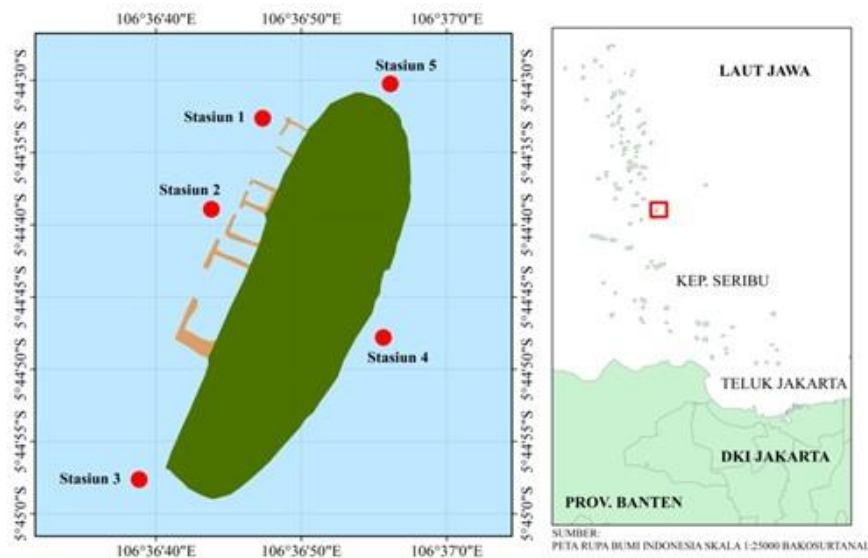
Askar dkk (2018) telah berhasil mengisolasi kelompok bakteri *coliform* yang mengkontaminasi jenis foraminifera besar yaitu *Calcarina* dari lingkungan perairan di ekosistem terumbu karang Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa bakteri *coliform* ditemukan pada foraminifera *Calcarina* dengan kelimpahan <math><3-16\text{ mpn}/100\text{ ml}</math>. Identifikasi molekuler terhadap isolat bakteri *coliform* tersebut dilakukan pada penelitian ini dengan berbasis pada

marka gen 16S rRNA, yang merupakan marka universal pada kelompok prokariotik (Lane, 1991).

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di perairan Pulau Pramuka, Kab. Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. Pengambilan sampel dilakukan pada 5 (lima) stasiun (Gambar 1). Sampel yang diambil berupa sampel sedimen dasar perairan. Pada saat pengambilan sampel, sedimen dimasukkan ke dalam plastik *ziplock*. Semua sampel diberi label dan dimasukkan ke dalam *coolbox* sampai tiba di laboratorium. Selama kegiatan pengambilan sampel juga dilakukan pengukuran parameter fisik lingkungan seperti : salinitas, suhu, DO dan pH perairan.



Gambar 1. Lokasi dan Stasiun Pengambilan Sampel di Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta

Pemisahan dan Identifikasi Jenis Foraminifera

Identifikasi jenis foraminifera dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Molekuler (MICROMOL), Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran. Metode pemisahan

foraminifera mengacu pada Kennedy and Zeidler (1976). Pencucian sampel sedimen dilakukan di atas saringan berukuran 0,063 mm hingga bersih dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 30 °C selama 2 jam. Sampel yang sudah kering kemudian diayak menggunakan saringan dengan

ukuran mata saring 0,0250 mm, 0,125 mm dan 0,063 mm. Tahap selanjutnya adalah pemisahan foraminifera dari sedimen yaitu menyebarkan sedimen yang telah dicuci pada *extraction tray* di bawah mikroskop binokuler secara merata. Foraminifera yang tampak dan terdapat dalam sedimen tersebut kemudian diambil dan disimpan pada *foraminifera slide*. Kemudian dilakukan proses identifikasi jenis yang didapat. Jenis *Calcarina* yang didapat kemudian dipisahkan.

Isolasi Bakteri Coliform dari Foraminifera Jenis *Calcarina*

Bakteri *coliform* diisolasi dari foraminifera jenis *Calcarina* dengan menumbuhkannya pada medium Endo Agar (Oxoid™), medium spesifik *coliform*, dengan pelarut air laut steril (salinitas 30‰). Foraminifera jenis *Calcarina* yang didapat dari proses pemisahan kemudian diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis (0,85%) di atas cawan keramik steril, digerus dan dimohogenkan. Sebanyak 100 µL larutan homogen kemudian dituang di atas permukaan Endo Agar yang sudah memadat, diratakan dengan *L-glass* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 16 jam. Koloni bakteri *coliform* tumbuh di atas permukaan agar dengan warna hijau metalik. Koloni bakteri *coliform* yang tumbuh kemudian dipindahkan ke medium baru dengan menggunakan jarum Ose, diinkubasi kembali pada 30°C selama 16 jam. Proses ini dilakukan beberapa kali hingga didapatkan isolat tunggal.

Ekstraksi DNA genome Isolat Bakteri *Coliform*

Isolat tunggal bakteri *coliform* dikultur dalam medium Endo Broth (Oxoid™) pada inkubator shaker dengan kecepatan putaran 150 rpm pada suhu 30°C hingga didapatkan *Optical Density* (OD) kultur = 0,5. Kultur dipanen dengan bantuan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Pelet

sel bakteri *coliform* yang ada di dasar tabung digunakan untuk proses ekstraksi DNA genom. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega™) dan tahapan dilakukan sesuai dengan instruksi dari perusahaan (Promega, 2014). Genome yang didapat kemudian diukur konsentrasi dan kemurniaannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis. DNA genome disimpan pada *freezer* dengan temperatur -20 °C sampai diperlukan untuk tahap penelitian berikutnya.

Amplifikasi fragmen marka gen 16S rRNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pasangan primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), yang secara khusus menargetkan amplicon sepanjang 1,465 bp dari gen 16S rRNA yang dimiliki bakteri (Lane, 1991), digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen 16S rRNA dari DNA genom dengan metode PCR. Komponen reaksi PCR (*cocktail*) terdiri dari : 1X GoTaq Green Master Mix (Promega™), 10 pmol dari masing-masing primer, disesuaikan dengan volume akhir 25 µL dengan NFW. Adapun program PCR diatur sebagai berikut: 95°C selama 120 detik (pre-denaturasi), diikuti oleh 30 siklus 95°C selama 45 detik (*denaturasi*), 51°C selama 60 detik (*annealing*), dan 72°C selama 60 detik (*elongasi*), kemudian perpanjangan akhir 72°C selama 5 menit (*elongasi akhir*). Produk PCR kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agaros 1% yang diwarnai dengan GelRed (Biotum™). Produk PCR kemudian dikirim ke perusahaan jasa layanan sekuensing 1st Base™ di Singapura untuk disekuensing dengan metode Sanger (Agung *et al.*, 2020).

BLAST dan Analisis Filogenetik

Urutan nukleotida hasil sekuensing dari fragmen gen 16S rRNA dari isolat bakteri *coliform* kemudian dianalisis (*contig*) menggunakan BioEdit™. Urutan fragmen kemudian diidentifikasi dengan mensejajarkan (*aligning*) dengan database yang tersedia di NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool / BLAST™*. Pensejajaran (*aligning*) dilakukan dengan menggunakan program ClustalW™ dan pohon filogeni dikonstruksi menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan 1000 ulangan *bootstrap* dengan

bantuan perangkat lunak MEGA™ 7.0 (Agung *et al.*, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi DNA Genom Bakteri *Coliform*

DNA genom isolat bakteri *coliform* dari 5 (lima) stasiun berhasil diekstraksi. Konsentrasi DNA genom dari kelima isolat dapat dilihat pada Tabel 1. Konsentrasi berkisar antara 157,5 µg/mL - 230 µg/mL dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar antara 1,477-1,769.

Tabel 1. Konsentrasi dan Kemurnian DNA genom isolat bakteri *coliform*

No	Kode Sampel	Absorbansi pada λ 260 nm	Absorbansi pada λ 280 nm	Kemurnian (A_{260}/A_{280})	Konsentrasi gDNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	IS-1	0,063	0,041	1,537	157,5
2	IS-2	0,065	0,044	1,477	162,5
3	IS-3	0,087	0,052	1,673	217,5
4	IS-4	0,092	0,052	1,769	230,0
5	IS-5	0,072	0,044	1,636	180,0

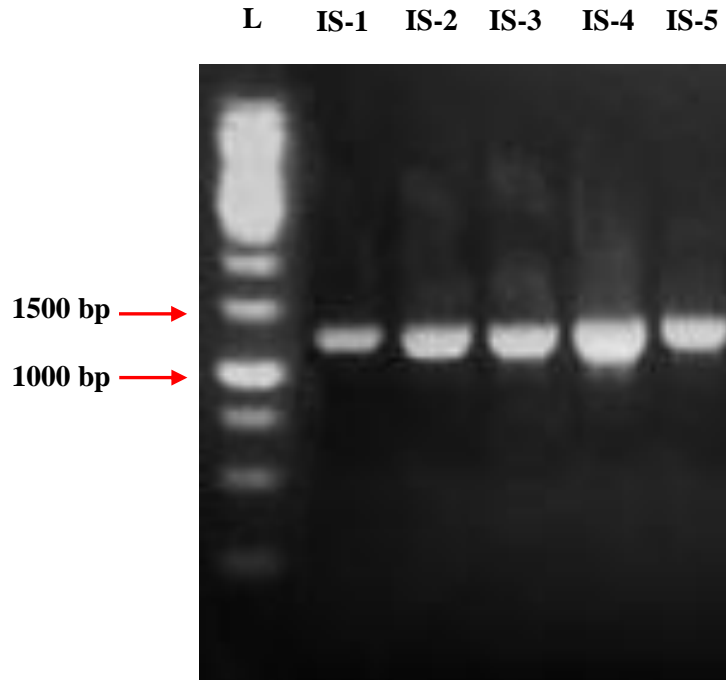
Keterangan :

IS-1, -2, -3, -4, dan -5 : Isolat dari sampel stasiun ke-1, -2, -3, -4, dan -5

Konsentrasi dan kemurnian DNA genom akan mempengaruhi keberhasilan proses berikutnya. Konsentrasi merepresentasikan seberapa banyak molekul DNA genome yang berhasil diekstraksi dari sel bakteri. Sementara kemurniaan menunjukkan kondisi kontaminasi molekul RNA ataupun protein dalam campuran DNA genom. Menurut Fatchiyah dkk (2011), DNA genom yang baik memiliki kemurnian sekitar 1,8. Dari Tabel 1 di atas, terlihat bahwa konsentrasi dan kemurnian DNA genom dari isolat bakteri *coliform* yang diisolasi dari kelima stasiun sudah sesuai dengan kelayakan untuk pengerjaan proses selanjutnya yaitu amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR. Genom dari isolat

bakteri yang diisolasi dari stasiun 4 diketahui memiliki konsentrasi dan kemurnian yang paling tinggi yaitu sebesar 230 µg/mL dengan kemurnian mencapai 1,769, bila dibandingkan dengan isolat yang lain.

Hasil amplifikasi fragmen gen 16S rRNA juga memperlihatkan hasil yang positif. Pita-pita DNA ampikon muncul terang di ukuran antara 1000 s.d. 1500 bp (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa proses amplifikasi fragmen DNA gen 16S rRNA dari genom isolat bakteri *coliform* dari kelima stasiun berhasil dilakukan oleh pasangan primer 27F dan 1492R, yang mentarget ampikon sepanjang 1465 bp.



Gambar 2. Elektroferogram hasil amplifikasi fragmen gen 16S rRNA dari DNA genom isolat bakteri *coliform* yang mengkontaminasi foraminifera jenis *Calcarina* pada gel agarosa 1% IS-1, -2, -3, -4, -5 : Isolat dari sampel stasiun ke-1, -2, -3, -4, dan -5
L : 1 kb DNA Ladder (Fermentas™)

Secara kualitatif, ketebalan pita DNA dapat merepresentasikan konsentrasinya (Fatchiyah dkk, 2011). Dari gambar 2, terlihat bahwa ampikon fragmen gen 16S rRNA pada isolat yang diisolasi dari stasiun 4 memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain, di mana isolat stasiun 4 juga merupakan isolat dengan konsentrasi dan kemurnian DNA

genom yang paling tinggi bila dibandingkan dengan isolat yang lain.

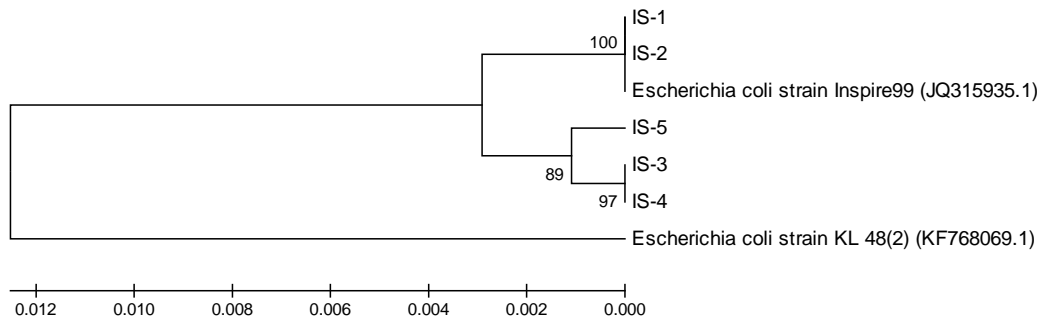
Hasil analisis pensejajaran sekuen (BLAST) nukleotida fragmen gen 16S rRNA dari kelima isolat bakteri *coliform* dengan database di genBank NCBI menunjukkan bahwa kelima isolat memiliki kedekatan dengan isolat bakteri *Eschericia coli* strain *inspire99* (Acc No. JQ315935.1) (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil BLAST sekuen gen 16S rRNA isolat bakteri *coliform* dengan database NCBI

No.	Kode Isolat	Spesies Terdekat	Identity (%)	Query Cover (%)	Accession Number
1	IS-1	<i>Eschericia coli</i> strain <i>inspire99</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	100	JQ315935.1
2	IS-2	<i>Eschericia coli</i> strain <i>inspire99</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	100	JQ315935.1
3	IS-3	<i>Eschericia coli</i> strain <i>inspire99</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	98	JQ315935.1
4	IS-4	<i>Eschericia coli</i> strain <i>inspire99</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	98	JQ315935.1
5	IS-5	<i>Eschericia coli</i> strain <i>inspire99</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	99	JQ315935.1

Sementara itu, hasil konstruksi pohon filogenetik (Gambar 3) juga menunjukkan bahwa kelima isolat memiliki kedekatan erat dengan isolat bakteri *Escherichia coli* strain *inspire99* (Acc No. JQ315935.1), yang disolasi dari perairan Teluk Benggala, India,

dengan nilai *bootstrap* yang cukup tinggi, berkisar antara 89-100. Menurut Hillis and Bull (1993), nilai *bootstrap* di atas 70 menunjukkan kemungkinan $\geq 95\%$ organisme tersebut memiliki persamaan yang besar dan dapat dipercaya.



Gambar 3. Pohon Filogenetik (*Neighbor-joining*) Berbasis Marka Gen 16S rRNA dari Isolat Bakteri Coliform yang diisolasi dari Foraminifera jenis *Calcarina* di Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta, dengan 1000 ulangan *bootstrap*

Kekerabatan yang sangat dekat antara isolat bakteri *coliform* yang diisolasi dari foraminifera jenis *Calcarina* yang berasal dari perairan Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta dengan bakteri *E. coli* yang diisolasi dari perairan Teluk Benggala, India bisa terjadi karena adanya konektivitas ekologi yang terbuka di perairan laut, yang menyebabkan distribusi mikrobiota dari berbagai perairan dengan karakteristik lingkungan yang hampir mirip (Frank *et al.*, 2016; Bishop *et al.*, 2017). Teluk Benggala terletak masih satu hamparan dengan perairan Indonesia, termasuk perairan Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta.

KESIMPULAN

Hasil identifikasi molekuler berbasis marka gen 16S rRNA terhadap bakteri *coliform* yang mengkontaminasi foraminifera jenis *Calcarina* yang diisolasi dari Perairan Pulau Pramuka, Kabupaten Kepulauan Seribu, DKI Jakarta menunjukkan bahwa 5 (lima) isolat tunggal bakteri *coliform* yang berasal dari 5 (lima) stasiun pengambilan sampel

memiliki kedekatan dengan isolat bakteri *Escherichia coli* strain *inspire99* (Acc No. JQ315935.1), yang disolasi dari perairan Teluk Benggala, India, dengan nilai *bootstrap* yang cukup tinggi berkisar antara 89-100. Kedekatan genetik ini juga menunjukkan adanya konektivitas ekologi antara perairan Teluk Benggala di India dengan perairan Pulau Pramuka di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung, M.U.K; I Maqbul, S Astuty, and Y Mulyani (2020) Bacterial Community Composition among Coral Diseases in Biawak Island using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Res.J.Chem.Environ.* 24 (1).
- Askar, A.T; M.U.K Agung, Y Andriani, dan L.P Yuliadi (2018) Kelimpahan Bakteri Coliform pada Air Laut, Sedimen, dan Foraminifera Jenis *Calcarina* di Ekosistem Terumbu Karang Pulau Pramuka, Kepulauan

- Seribu, DKI Jakarta. *Jurnal Akuatika Indonesia*. Vol 3 (1): 36-41
- Bernhard J.M; A Habura, and S.S Browser (2006) An Endobiont-bearing Allogromiid from the Santa Barbara Basin: Implications for the Early Diversification of Foraminifera. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, Vol. 111. doi:10.1029/2005JG000158
- Bishop, M.J; M.M Pinto, L Airoidi, L.B Firth, R.L Morris, L.H.L Loke, S.J Hawkins, L.A Naylor, R.A Coleman, S.Y Chee, and K.A Dafforn (2017) Effects of Ocean Sprawl on Ecological Connectivity: Impacts and Solutions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 492. doi: 10.1016/j.jembe.2017.01.021
- Dewi, K. T. dan Y. Darlan (2008) Partikel Mikroskopis Dasar Laut Nusantara. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi Kelautan (P3GL)*. Bandung
- Fatchiyah, E.L Arumingtyas, S. Widyarti dan S. Rahayu (2011) Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis. Erlangga, Jakarta. 191 hlm.
- Frank, A.H; J.A.L Garcia, G.J Herndl, and T Reinthaler (2016) Connectivity between Surface and Deep Waters Determines Prokaryotic Diversity in the North Atlantic Deep Water. *Environmental Microbiology*. Vol. 18 (6). doi: 10.1111/1462-2920.13237
- Hillis, M. D and Bull, J.J (1993) An Empirical Test of Bootstrapping As A Method For Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst.Biol.* 42(2): 182-192
- Kennedy, C and W. Zeidler (1976) The Preparation of Oriented Thin Sections In Micropaleontology: An Improved Method For Revealing The Internal Morphology of Foraminifera and Other Microfossils. *Micropaleontology* 22 (1): 104-107
- Lane, D.J (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Eds). *John Wiley and Sons*. New York: 115-117
- Prazeres., M.; T Ainsworth., T. Edward Roberts., John M. Pandolfi and William Leggat (2017) Symbiosis and microbiome flexibility in calcifying benthic foraminifera of the Great Barrier Reef. *Microbiome*. 5 (38). doi: 10.1186/s40168-017-0257-7
- Pringgoprawiro, H. dan R. Kapid (2000) Foraminifera: Pengenalan Mikrofosil dan Aplikasi Biostratigrafi. *Penerbit ITB*. Bandung.
- Promega (2014) Wizard™ Genomic DNA Purification Kit: Technical Manual (www.promega.com)
- Richardson, S.L.and K. Rutzler (1999) Bacterial Endosymbiots in the Agglutinating Foraminiferan *Spiculidendreon corallicum*. *Symbiosis*, (26) 299-312.
- Talge, H.K and P Hallock (1995) Cytological Examination of Symbiont Loss in a Benthic Foraminifera, *Amphistegina gibbosa*. *Marine Micropaleontology*. Vol. 26. doi: 10.1016/0377-8398(95)00015-1

van Bruggen, J.J.A; C.K Stumm, and G.D Vogels (1983) Symbiosis of Methanogenic Bacteria and Sapropelic Protozoa. *Arch. Microbiol.* Vol. 136. doi: 10.1007/BF00404779

Yamano, H., T. Miyajima, and I. Koike (2000) Importance of foraminifera for the formation and maintenance of a coral sand cay: Green Island, Australia. *Coral Reefs* 19,51-58. doi: 10.1007/s003380050226