

Direct PCR pada Escherichia coli: metode sederhana dan hemat

Direct PCR for Escherichia coli: a straightforward and cost-effective method

Desy Aryani Harahap^{1*}, Zulham Yamamoto², Sry Suryani Widjaja³, Evita Mayasari⁴

^{1,2,3,4} Universitas Sumatera Utara, Indonesia

Jl. Dr. Mansyur No.5, Padang Bulan, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara 20155
harahap.desyaryani@gmail.com, zulham@usu.ac.id, srysuryani@gmail.com, evita@usu.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan metode *direct PCR* dengan *standard PCR* untuk deteksi bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* merupakan organisme yang paling banyak digunakan dalam bidang biologi. Deteksi bakteri ini pada air dan makanan juga merupakan hal yang rutin dilakukan secara global, salah satunya dengan metode PCR. Ekstraksi DNA adalah proses awal dalam rangkaian persiapan PCR dan umumnya membutuhkan kit komersial. Proses ekstraksi DNA membutuhkan tambahan biaya, waktu dan tenaga. Oleh karena itu diperlukan metode alternatif seperti *direct PCR* yang melewati tahap ekstraksi. Dengan metode PCR, dinding sel bakteri akan mengalami lisis sehingga DNA dapat keluar dan diamplifikasi oleh enzim Taq polimerase. Sebanyak dua kelompok, masing-masing terdiri dari tiga kopi reaksi (*triplicate*), dipersiapkan untuk PCR dengan menggunakan *template* DNA yang berbeda. Kelompok pertama menggunakan biakan bakteri *Escherichia coli* secara langsung sedangkan kelompok kedua menggunakan DNA *Escherichia coli* yang diekstraksi dengan kit komersial. Penelitian ini berhasil melakukan amplifikasi gen *meth* *Escherichia coli* tanpa melewati proses ekstraksi DNA. Analisis dengan elektroforesis menunjukkan bahwa produk *direct PCR* dengan ukuran 300 bp tervisualisasi lebih tebal dibanding produk *standard PCR*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode *direct PCR* dapat digunakan sebagai alternatif dalam deteksi *Escherichia coli* sehingga menghemat biaya, waktu, dan tenaga.

Kata kunci: *Direct PCR*; *E. coli*; Ekstraksi DNA; Koloni.

Abstract

This study compares the *direct PCR* method with *standard PCR* to detect *Escherichia coli*. *Escherichia coli* is the most widely used organism in biology. Detection of *E. coli* in water and food is routinely performed, utilizing methods like PCR. The initial stage of PCR preparation involves DNA extraction, which requires a commercial kit. Consequently, this extraction process incurs additional expenses, time, and labor. Therefore, an alternative method is needed, such as *direct PCR*, which can circumvent the need for DNA extraction. The PCR process facilitates lysis of the bacterial cell wall, releasing nucleic acids, which can then be amplified by Taq polymerase. For the PCR procedure, two groups were formed, each comprising three replicates of the reaction with different DNA templates. The first group utilized a direct culture of *Escherichia coli*, while the second group incorporated the extracted DNA of *Escherichia coli*. Our study successfully amplified the *meth* gene of *Escherichia coli* without DNA extraction. Electrophoresis analysis revealed that the *direct PCR* product, sized at 300 bp, appeared more pronounced than the *standard PCR* product. The findings of this research demonstrated *direct PCR* as an alternative for detecting *Escherichia coli*, which would lead to reductions in costs, time, and labor.

Keywords: Colony; *Direct PCR*; DNA extraction; *E. coli*.

* Corresponding Author Desy Aryani Harahap, Universitas Sumatera Utara, Kota Medan, Indonesia

E-mail : harahap.desyaryani@gmail.com

Doi : 10.35451/jkg.v7i2.2606

Received : Maret 10, 2025. Accepted: April 1, 2025. Published: April 30, 2025

Copyright (c) 2025 : Desy Aryani Harahap. Creative Commons License This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

1. PENDAHULUAN

Berbagai mikroorganisme yang terdapat di air, tanah, dan makhluk hidup (tumbuhan dan hewan) merupakan bagian dari proses ekologi kompleks yang memainkan peranan penting dalam kesehatan masyarakat. Mempelajari proses dan hubungan ini sering kali dimulai dengan menilai keanekaragaman bakteri dan mengidentifikasi spesies bakteri [1]. Selain berdampak terhadap kesehatan, bakteri juga sangat erat kaitannya dengan kualitas dan keamanan pangan, sehingga proses deteksi dan identifikasi bakteri dibutuhkan secara cepat dan efisien [2].

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan salah satu teknik biologi molekular yang cepat dan efisien, tidak hanya untuk deteksi namun juga untuk kuantifikasi dan *profiling* gen bakteri [3]. Penelitian mikrobiologi memanfaatkan PCR untuk berbagai tujuan dan umumnya melibatkan pengujian sampel yang mengandung beragam organisme dari berbagai spesies, Genus, Famili, Ordo, Kelas, Filum, dan Kingdom. PCR juga dapat dimanfaatkan untuk mengembangkan alat bantu diagnostik [4]. Persiapan cetakan (*template*) DNA adalah salah satu tahap kritis dalam PCR [5].

Kendala umum dalam melakukan eksperimen berbasis PCR adalah proses ekstraksi DNA genomik (gDNA) yang memakan waktu, biaya, dan tenaga [1,5]. Kebanyakan mikroorganisme memiliki dinding sel yang terdiri dari beragam makromolekul dan menjadi penghalang signifikan dalam proses ekstraksi DNA. Untuk mengekstrak DNA dari sel secara efektif, maka dinding sel harus dihancurkan sehingga kandungan intraseluler, termasuk DNA, dapat diakses [5]. Dalam penelitian berbasis PCR, kit ekstraksi DNA umumnya dibeli dari perusahaan luar negeri dengan biaya yang tergolong mahal [6].

Salah satu metode non-mekanik untuk menghancurkan dinding sel adalah *thermal lysis* yang menggunakan suhu tinggi, $\pm 95^{\circ}\text{C}$ secara konstan selama 2 menit, untuk mendenaturasi protein pada membran sel, menghancurkan sel, dan mengeluarkan komponen intraseluler [7]. Berdasarkan hal tersebut, idealnya metode PCR langsung (*direct PCR*) dapat digunakan sebagai alternatif yang lebih sederhana, tanpa memerlukan langkah ekstraksi gDNA [1]. Tahap pertama dalam PCR adalah *denaturation* yang menggunakan suhu $94-95^{\circ}\text{C}$ selama beberapa menit [8]. Dengan peningkatan suhu tersebut, maka dinding sel bakteri akan mengalami lisis dan proses amplifikasi DNA dapat berlangsung. Selain itu, mayoritas teknik *direct PCR* juga didasari oleh penggunaan enzim DNA polimerase yang dimodifikasi secara genetik sehingga memungkinkan amplifikasi tanpa ekstraksi asam nukleat. *Direct PCR* dapat menghemat biaya, waktu, dan tenaga, serta meminimalisir *human error* dan kontaminasi silang pada sampel [9,10].

Escherichia coli merupakan organisme yang paling banyak dipelajari dan bersifat instrumental dalam pengembangan berbagai konsep fundamental dalam biologi [10]. *E. coli* adalah organisme pilihan untuk menjadi *host* dalam mayoritas studi biologi karena kemudahan penanganan, waktu pembelahan yang cepat, serta protokol ekspresi yang sudah sangat diketahui dengan baik [11]. Selain itu, monitoring keberadaan *E. coli* merupakan hal yang luas dilakukan karena kontaminasi bakteri ini pada sumber makanan dan minuman merupakan ancaman global terhadap kesehatan [12]. Penelitian menunjukkan bahwa lebih dari 50% makanan jajanan terkontaminasi bakteri *E. coli* [13].

Karena luasnya penggunaan *E. coli*, maka perlu diketahui efisiensi metode *direct PCR* terhadap deteksi bakteri ini. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil amplifikasi *direct PCR* yang menggunakan koloni *E. coli* secara langsung dengan *standard PCR* yang menggunakan *template* DNA *E. coli* hasil ekstraksi.

2. METODE

Escherichia coli ATCC 25922 (Culti Loops™ Thermo Scientific, USA) dikultur pada media *Nutrient agar* dengan metode *spread plate*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh disubkultur pada Luria Bertani *agar plate* (LBAP) dan diinkubasi satu malam pada suhu 37°C . Koloni yang tumbuh diberi pewarnaan gram dan diperiksa secara mikroskopis. Beberapa koloni dipanen untuk dilakukan ekstraksi DNA, dan sisanya dibiarkan pada media cawan untuk digunakan secara langsung pada reaksi PCR. LBAP ditutup dengan Parafilm®, lalu disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

DNA genomik *E. coli* diekstraksi dengan metode *spin-column* menggunakan kit komersial (The Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, Geneaid, Taiwan) sesuai protokol penyedia. Secara singkat, koloni bakteri diambil menggunakan *disposable inoculating loop* 10 µL dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus berisi 180 µL bufer GT. Tabung divortex, kemudian proteinase K sebanyak 20 µL ditambahkan ke dalam tabung. Tabung diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan bufer GB sebanyak 200 µL, tabung kembali diinkubasi pada suhu 70°C selama 15 menit, diikuti penambahan 200 µL etanol absolut dan pencampuran dengan cara divortex.

Isi tabung dipindahkan ke dalam tabung GD yang telah dirakit dan disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Tabung GD dirakit pada tabung penampung yang baru, kemudian diberi penambahan bufer W1 sebanyak 400 µL. Tabung disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik, cairan yang terkumpul dibuang, kemudian *wash buffer* sebanyak 600 µL ditambahkan pada tabung GD. Tabung disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik, cairan yang terkumpul dibuang, dan tabung disentrifus kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. Tabung penampung kemudian dibuang dan tabung GD dipindah ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL. Terakhir dilakukan penambahan 100 µL *elution buffer* ke dalam tabung GD, tabung didiamkan selama 3 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Tabung GD dibuang, dan hasil ekstraksi yang terkumpul di tabung mikrosentrifus dikuantifikasi dengan Implen NanoPhotometer®.

Untuk mengidentifikasi *E. coli*, satu pasang primer dirancang dari gen *methionine synthase/metH* (*accession* CP009072.1, *genomic location* 2194769-2198452) melalui situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Sekuens oligonukleotida yang digunakan dalam penelitian ini adalah: primer *forward* 5'-GCGTAAAGTCTACTGGGGCT-3'; dan primer *reverse* 5'-TTACGGCGGGCATAGTCTTC-3'; dengan ukuran produk PCR 300 bp.

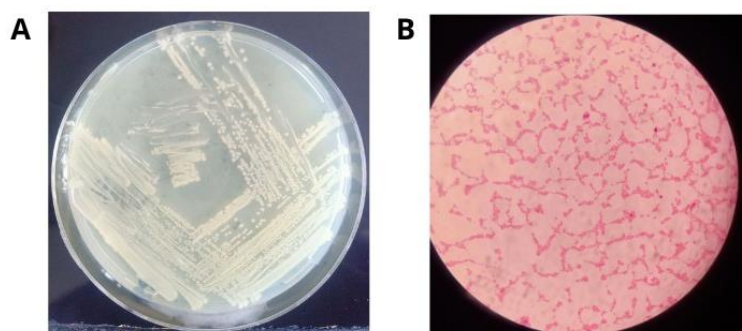
Amplifikasi PCR dilakukan pada dua kelompok masing-masing dengan total volume reaksi 25 µL, terdiri dari 12,5 µL GoTaq® green master mix (Promega, USA), 1 µL primer *forward* dan 1 µL primer *reverse*. Untuk kelompok pertama dilakukan *direct* PCR, yaitu memasukkan koloni *E. coli* dari media LBAP secara langsung ke dalam tabung reaksi PCR. Satu koloni *E. coli* diambil menggunakan tip mikropipet 10 µL dan dimasukkan ke dalam campuran reagen PCR, kemudian dilakukan penambahan 10,5 µL *nuclease-free water*. Pada kelompok kedua digunakan 1 µL hasil ekstraksi DNA *E. coli* dan 9,5 µL *nuclease-free water*.

Tiga tabung PCR (triplet) dipersiapkan untuk kedua kelompok, amplifikasi dilakukan pada *thermal cycler* (Veriti™ Dx, Thermo Fisher Scientific) dengan pengaturan: 1 siklus denaturasi awal suhu 95°C selama 2 menit; 35 siklus denaturasi suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* suhu 58°C selama 30 detik, ekstensi suhu 72°C selama 1 menit; dan 1 siklus ekstensi akhir suhu 72°C selama 5 menit.

Produk PCR sebanyak 5 µL dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarose 1% (b/v) yang diwarnai Ethidium Bromida 2% (Merck, USA) dalam bufer TAE (Merck, USA). DNA *ladder* ukuran 100 bp (Geneaid, Taiwan) dimuat ke dalam gel agarose untuk digunakan sebagai referensi standar. Elektroforesis dijalankan pada voltase 90 selama 80 menit. Gel agarose ditempatkan pada UVITEC Gel Documentation System & Software (Clever Scientific, UK) untuk visualisasi dan analisis.

3. HASIL

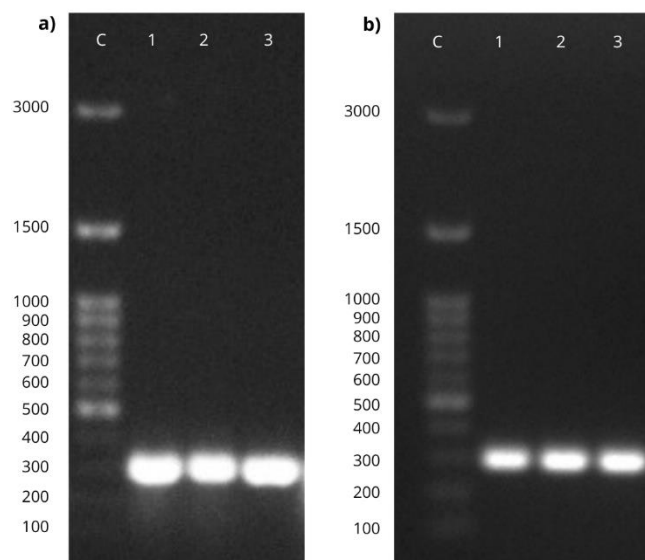
Tampak pertumbuhan koloni pada LBAP setelah 24 jam. Analisis mikroskopis dilakukan setelah pengecatan gram dan menunjukkan karakteristik bakteri gram negatif, yang konsisten dengan *E. coli* (Gambar 1).



Gambar 1. Kultur *Escherichia coli* ATCC 25922. A) Tampak pertumbuhan koloni pada LBAP setelah satu malam. B) Pengecatan gram menunjukkan sel berwarna kemerahan yang konsisten dengan bakteri gram negatif.

Kuantifikasi terhadap hasil ekstraksi DNA menunjukkan konsentrasi 106,15 ng/μL dan kemurnian 1,969. Amplifikasi PCR dijalankan menggunakan dua jenis *template* DNA masing-masing dalam rangkap tiga.

Satu pasang primer yang dirancang untuk penelitian ini berhasil mengamplifikasi produk yang spesifik. Produk *direct* PCR tervisualisasi dengan baik sesuai ukuran yang diharapkan pada gel agarose. Tampak amplifikasi tunggal tanpa produk non-spesifik pada ketiga sampel (Gambar 2a). Visualisasi produk PCR yang menggunakan hasil ekstraksi DNA juga menunjukkan terbentuknya produk PCR yang diharapkan pada ketiga kelompok (Gambar 2b).



Gambar 2. Visualisasi produk PCR pada agarose 1%. a) Produk *direct* PCR sebanyak tiga rangkap tervisualisasi dengan intensitas yang lebih tinggi dibanding b) produk *standard* PCR. C memuat DNA *ladder* komersial. Lane 1-3 berisi triplet produk PCR yang terlihat membentuk pita tunggal dan *yield* yang jelas.

4. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, deteksi gen yang bersumber dari *template* DNA *E. coli*, baik yang diekstraksi maupun tanpa ekstraksi, berhasil dilakukan dengan PCR. PCR sudah dikenal baik akan spesifisitasnya yang tinggi, dan mampu mengamplifikasi sejumlah kecil asam nukleat menjadi jutaan kopi[14]. Penelitian serupa oleh Hariri juga berhasil

mendeteksi *E. coli* pada berbagai sampel makanan dengan metode standard PCR [15]. Oleh karena itu, PCR dapat menjadi pilihan untuk deteksi dan identifikasi *E. coli* secara rutin.

Penelitian serupa juga berhasil melakukan amplifikasi gen *E. coli* dan *S. aureus* dengan metode *direct* PCR [16]. Hal ini membuka peluang bahwa teknik *direct* PCR dapat dimanfaatkan untuk diagnosis cepat berbagai penyakit infeksi dan deteksi patogen untuk berbagai kepentingan. Penelitian sejalan [6] misalnya berhasil mendeteksi *Salmonella thymurium* dari sampel makanan dengan metode *direct* PCR. Penelitian lain memanfaatkan teknik *direct* PCR untuk identifikasi spesies *microalgae* (*Nannochloropsis gaditana*) [17].

Visualisasi produk *direct* PCR menunjukkan pita yang lebih tebal dan terang dibanding produk PCR hasil ekstraksi. Ketebalan pita produk PCR secara relatif menggambarkan jumlah molekul DNA pada sampel. Pita dengan intensitas tinggi menunjukkan jumlah DNA yang melimpah, sedang pita dengan intensitas rendah mengindikasikan rendahnya kandungan molekul DNA. Konsentrasi rendah *template* DNA dapat menurunkan efektivitas reaksi PCR sehingga menghasilkan produk dengan *yield* rendah, sedang konsentrasi tinggi *template* DNA dapat meningkatkan efisiensi reaksi PCR namun kemungkinan terbentuknya produk non-spesifik juga meningkat [18]. Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan koloni *E. coli* tanpa tahap ekstraksi DNA menghasilkan konsentrasi *template* DNA yang lebih tinggi.

Hasil ini berbeda dengan penelitian Fitriyah dkk.[17], yang menunjukkan pita lebih tebal dihasilkan oleh produk PCR yang menggunakan DNA *microalgae* hasil ekstraksi. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis organisme yang digunakan. *Nannochloropsis gaditana* merupakan salah satu mikroalga dengan karakteristik dinding sel yang tebal sehingga lebih sulit didegradasi [19]. Sebaliknya, *E. coli* merupakan bakteri gram negatif dengan dinding sel yang lebih tipis.

Hal ini lebih lanjut didukung oleh hasil penelitian yang menyatakan bahwa perbedaan morfologi dinding sel (status gram bakteri) secara signifikan mempengaruhi efisiensi amplifikasi metode *direct* PCR [16]. Studi mereka menunjukkan bahwa *S. aureus* sebagai bakteri gram positif dengan dinding sel yang tebal lebih resisten terhadap *thermal lysis* dan menghasilkan produk PCR dengan *yield* yang lebih rendah dibanding *E. coli* [16].

Bakteri gram negatif, seperti *Escherichia coli*, memiliki dinding sel peptidoglikan tipis (beberapa nanometer), yang terletak diantara dua membran lain yaitu membran luar dan membran dalam/membran sitoplasma [20,21]. Sedangkan pada spesies gram positif, tidak ditemukan adanya membran luar, namun dinding sel peptidoglikan spesies ini jauh lebih tebal. Oleh karena itu, pada beberapa spesies perlu penambahan teknik *mechanical lysis* dalam persiapan sampel sebelum melakukan PCR [16]. Langkah tambahan yang dapat diterapkan terhadap bakteri gram positif misalnya inkubasi pada suhu 95°C selama 15 menit dan vortex selama 15 menit. Kedua langkah tersebut dapat dilakukan tanpa biaya tambahan dan terbukti menghasilkan amplifikasi *direct* PCR yang baik [22].

Idealnya, lisis dinding sel dan akses terhadap asam nukleat untuk amplifikasi PCR, dapat dilakukan tanpa tambahan proses ekstraksi dan purifikasi. Namun, efisiensi teknik *direct* PCR sangat bergantung pada jenis organisme yang digunakan. Semakin kompleks jenis organisme maka dibutuhkan pula beberapa langkah tambahan untuk proses lisis sel. Secara keseluruhan, metode *direct* PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen *E. coli* dengan efektif dan cepat. Namun, penelitian dan optimasi lebih lanjut perlu dilakukan untuk jenis organisme yang berbeda.

5. KESIMPULAN

Penelitian ini mendemonstrasikan bahwa *direct* PCR dapat secara efektif mengamplifikasi gen *Escherichia coli*. Penggunaan metode ini dapat memangkas biaya yang dikeluarkan untuk membeli kit ekstraksi DNA serta lebih efisien waktu dan tenaga. Oleh karena itu, *direct* PCR dapat dipertimbangkan sebagai metode pilihan dalam deteksi *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Song F, Kuehl J V, Chandran A, Arkin AP. A simple, cost-effective, and automation-friendly direct PCR approach for bacterial community analysis. *mSystems* [Internet]. 2021;6(5). Available from: <https://doi.org/10.1128/mSystems>.
- [2] Flint A, Laidlaw A, Li L, Raitt C, Rao M, Cooper A, et al. Choice of DNA extraction method affects detection of bacterial taxa from retail chicken breast. *BMC Microbiol*. 2022;(1).
- [3] Salam MA, Al-Amin MY, Pawar JS, Akhter N, Lucy IB. Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Elsevier B.V. 2023; (30).
- [4] Perdana TM, Dwiputro AH, Wijaya YOS, Satoto TBT. Pengaruh Enzim Taq Polimerase dan Suhu Annealing terhadap Amplifikasi Gen Tropomyosin *Sarcoptes scabiei*. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan* [Internet]. 2024;20 (2). Available from: <https://jurnal.umj.ac.id/index.php/JKK>
- [5] Liu Y, Chen J, Cheng Y, Li Y, Li X, Zhang Z, et al. A simple and rapid technique of template preparation for PCR. *Front Microbiol*. 2022; 10(13).
- [6] Sophian A, Purwaningsih R, Muindar M, Igrisa EPJ, Amirullah ML. Use of direct PCR technique without DNA extraction in confirmation test for *Salmonella typhimurium* bacteria on meatball samples. *Borneo Journal of Pharmacy*. 2021; 4(4):324–32.
- [7] Grigorov E, Kirov B, Marinov MB, Galabov V. Review of microfluidic methods for cellular lysis. *Micromachines*. MDPI AG. 2021; (12).
- [8] Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019; 1 (6):436–56.
- [9] Tao ZY, Zhang PY, Zhang L, Li CC, Hu R, Zhu HW, et al. The comparison of PCR kits for the detection of erythrocytic parasites on filter paper. *J Trop Med*. 2022.
- [10] Ruiz N, Silhavy TJ. How *Escherichia coli* became the flagship bacterium of molecular biology. *J Bacteriol*. 2022; 204(9).
- [11] Morão LG, Manzone LR, Clementino LOD, Wrenger C, Nascimento AS. A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. *PLoS One*. 2022;17.
- [12] Lehniger L, Rudloff A, Pollok S, Große N, Wessel K, Brendel M, et al. A model system for sensitive detection of viable *e. coli* bacteria combining direct viability pcr and a novel microarray-based detection approach. *Chemosensors*. 2021; 9(12).
- [13] Maharani NE, Sari DP, Permatasari AP. Relationship of Sanitation and Behavior of Food Handlers with *Escherichia coli* Contamination in Snack Food in the Pringgondani Field Wonogiri. *Jurnal Kesehatan Masyarakat & Gizi*. 2022; 5(1):182–7.
- [14] Kadri K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In: *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [Internet]. IntechOpen; 2020. Available from: <https://www.intechopen.com/books/synthetic-biology-new-interdisciplinary-science/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-and-applications>
- [15] Hariri S. Detection of *Escherichia coli* in food samples using culture and polymerase chain reaction methods. *Cureus*. 2022; 14(12).
- [16] Kai S, Matsuo Y, Nakagawa S, Kryukov K, Matsukawa S, Tanaka H, et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*. 2019; 9(3):548–57.
- [17] Fitriyah F, Faramitha Y, Sari DA, Kresnawaty I, Panji T, Santoso D. Improved direct lysis PCR amplification method of microalgal culture for sequencing and species identification. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing Ltd; 2021.
- [18] Mazlan AH, Muhamad Najib MHA, Hassan MH, Mohd Hatta FH, Yusoff RM. Effect of DNA template concentration on standard polymerase chain reaction. *International Journal of Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science* [Internet]. 2024; 7(1):1–11. Available from: <https://ir.uitm.edu.my/id/eprint/94561/>
- [19] Roncaglia B, Papini A, Chini Zittelli G, Rodolfi L, Tredici MR. Cell wall and organelle modifications during nitrogen starvation in *Nannochloropsis oceanica* F&M-M24. *J Appl Phycol*. 2021; 33(4):2069–80.
- [20] Oldewurtel ER, Kitahara Y, Cordier B, Wheeler R, Özbaykal G, Brambilla E, et al. Cell envelope growth of Gram-negative bacteria proceeds independently of cell wall synthesis. *EMBO J*. 2023; 42 (14).
- [21] Wong F, Amir A. Mechanics and dynamics of bacterial cell lysis. *Biophys J*. 2019; 116(12):2378–89.
- [22] Pesce C, Kleiner VA, Tisa LS. Simple colony PCR procedure for the filamentous actinobacteria *Frankia*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2019; 112(1):109–14.