

## Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA

Shafa Noer<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Fakultas MIPA, Prodi Pendidikan Biologi, Universitas Indraprasta PGRI

\*email: shafa\_noer@yahoo.co.id

### Article History

Received:  
20/12/2020  
Revised:  
10/01/2020  
Accepted:  
20/01/2020

### Kata kunci:

Bakteri  
16S rRNA  
Molekuler  
Identifikasi

### Key word:

Bacteria  
16S rRNA  
Molecular  
Identification

### ABSTRAK

Identifikasi bakteri secara molekular saat ini banyak dipilih oleh para peneliti diberbagai bidang terkait berbagai keuntungan dan kemudahan yang ditawarkannya. Salah satu metode identifikasi bakteri yang paling umum digunakan adalah dengan menggunakan penanda gen 16S rRNA. Panjang urutan gen 16S rRNA adalah sekitar 1.550 bp dan terdiri dari daerah yang dilestarikan (*conserved regions*). Beberapa keuntungan dalam identifikasi menggunakan 16S rRNA adalah dapat mengidentifikasi bakteri yang tidak dapat dikultur, memiliki tingkat akurasi yang tinggi, waktu yang dibutuhkan relatif cepat, dan lain-lain. Disamping berbagai kelebihanannya, ternyata metode ini juga memiliki beberapa kekurangan diantaranya tidak sesuai digunakan untuk spesies tertentu. Langkah identifikasi bakteri menggunakan 16S rRNA secara umum adalah ekstraksi DNA, amplifikasi daerah 16S menggunakan PCR, visualisasi gen menggunakan elektroforesis, sekuensing, dan mengolah data hasil sekuensing dengan bioinformatika.

### ABSTRACT

*Molecular identification of bacteria is currently being chosen by researchers in various fields regarding the various advantages and conveniences it offers. One of the most commonly used bacterial identification methods is the 16S rRNA gene marker. The 16S rRNA gene sequence length is approximately 1,550 bp and consists of conserved regions. Some of the advantages in identification using 16S rRNA are that it can identify bacteria that cannot be cultured, has a high degree of accuracy, the time required is relatively fast, and others. Apart from its various advantages, it turns out that this method also has several drawbacks including that it is not suitable for use for certain species. The steps to identify bacteria using 16S rRNA in general are DNA extraction, amplification of 16S regions using PCR, visualization of genes using electrophoresis, sequencing, and processing of sequenced data using bioinformatics.*

Copyright © 2021 LPPM Universitas Indraprasta PGRI. All Right Reserved

### PENDAHULUAN

Mikroorganisme merupakan organisme yang dapat dijumpai dimana-mana dalam jumlah yang melimpah. Salah satu mikroorganisme yang bersifat kosmopolit ini adalah bakteri. Bakteri dalam jumlah dan jenis serta sifat yang beragam dapat dijumpai hampir di semua tempat. Karena jumlah yang melimpah ini, maka tidak mengherankan bahwa banyak bakteri yang sampai saat ini belum dapat diidentifikasi secara menyeluruh.

Secara tradisional/konvensional, makhluk hidup diklasifikasikan berdasarkan kemiripan dan perbedaan karakteristik fenotipnya ke dalam prokariotik dan eukariotik serta lebih jauh lagi ke

dalam kingdom, filum, kelas, ordo, famili, genus dan spesies. Klasifikasi dengan cara ini seringkali menjadi sulit dikarenakan bervariasinya karakteristik fenotip dari makhluk hidup (Woo *et al.*, 2008).

Pada tahun 1980an, standar baru untuk mengidentifikasi bakteri mulai dikembangkan. Dalam berbagai penelitian para ahli menemukan bahwa terdapat hubungan filogenetik pada bakteri, atau lebih dalam, pada semua makhluk hidup, yang dapat ditentukan dengan membandingkan daerah tertentu dari kode genetik (Woese *et al.*, 1985). Daerah genetik ini dalam bakteri meliputi gen yang mengkode pada daerah 5S, 16S (juga disebut subunit kecil), dan 23S rRNA serta ruang-ruang di antara gen ini. Bagian

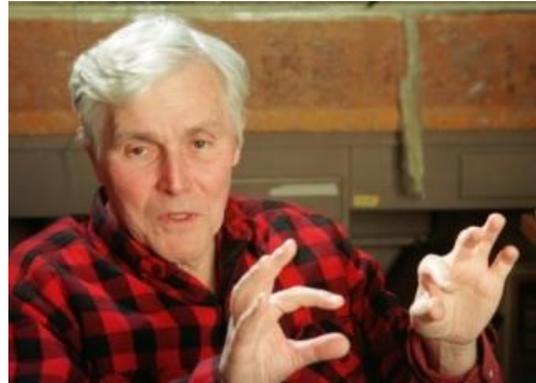
dari DNA yang sekarang paling umum digunakan untuk tujuan taksonomi untuk bakteri adalah gen 16S *ribosomal Ribonucleic acid* (16S rRNA) (Bottger, 1989). Sedangkan gen lainnya seperti 5S dan 23S dinilai lebih sulit untuk diterapkan dalam identifikasi bakteri. Karena kecepatan analisis dan kepraktisannya, maka tidak mengherankan saat ini gen 16S rRNA banyak digunakan dalam berbagai bidang penelitian bakteriologi terutama untuk tujuan identifikasi (Akihary & Kolondam, 2020).

## PEMBAHASAN

Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Perbandingan sekuens rRNA dapat menunjukkan hubungan evolusi antar organisme (Rinanda, 2011). Secara konvensional, identifikasi bakteri di laboratorium mikrobiologi klinik dilakukan dengan menggunakan tes fenotipe, termasuk tes fisiologi, tes Gram dan tes biokimia, dengan sifat kultur dan karakteristik pertumbuhan. Namun, metode identifikasi ini memiliki beberapa keterbatasan. Pertama, organisme dengan karakteristik biokimia yang berbeda dari setiap genus dan spesies yang diketahui kadang-kadang ditemui. Kedua, metode ini tidak dapat digunakan untuk organisme yang tidak dapat dikultur. Ketiga, identifikasi dari beberapa kelompok bakteri tertentu, seperti anerob dan mycobacteria, akan membutuhkan peralatan tambahan dan keahlian khusus, yang tidak tersedia di sebagian besar laboratorium dasar pada umumnya. Dengan menggunakan tehnik sekuensing 16S rRNA, masalah ini dapat ditangani dengan satu teknologi, yang juga memfasilitasi penemuan genus dan spesies baru (Woo *et al.*, 2008).

Banyak daerah lain pada genom juga telah digunakan untuk menguji hubungan filogenetik antar bakteri. Analisis genom secara keseluruhan juga telah dicoba, tapi hal ini cukup sulit karena genom memiliki ukuran yang berbeda-beda dan karena secara umum terjadi berbagai aktivitas pada gen seperti duplikasi gen, transfer gen, penghapusan gen, fusi gen, dan pembelahan gen. Saat ini hanya ada kurang dari 100 data genom utuh yang dapat dibandingkan. Namun, telah diamati bahwa hasil pohon filogenetik berdasarkan analisis genom utuh dan gen 16S rRNA ternyata memiliki kemiripan (Bansal & Mayer, 2003). Hal ini tentu merupakan nilai tambah lainnya dari analisis 16S

rRNA, karena memiliki hasil analisis yang serupa tanpa harus mensekuensing genom utuh dari suatu bakteri.



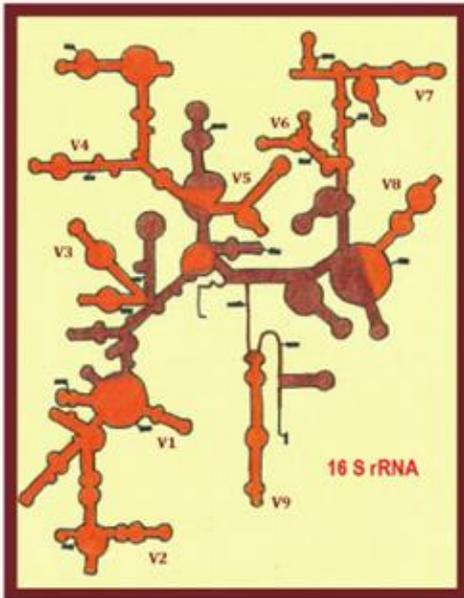
Gambar 1. Carl Woese, perintis metode 16S rRNA  
(Sumber: [www.alchetron.com](http://www.alchetron.com))

### Karakteristik Gen 16S rRNA

Panjang urutan gen 16S rRNA adalah sekitar 1.550 bp dan terdiri dari daerah yang dilestarikan (*conserved regions*). Gen ini relatif cukup besar, dengan polimorfisme interspesifik, untuk memperlihatkan perbedaan dan pengukuran yang valid secara statistik. Primer universal biasanya digunakan sebagai pelengkap ke daerah yang dilestarikan pada bagian awal gen dan di kedua wilayah 540-bp atau pada akhir urutan (sekitar wilayah 1.550 bp), dan urutan pada daerah variabel diantaranya digunakan untuk taksonomi perbandingan (Chen, 1989). Meskipun ukuran yang umum digunakan untuk sekuens dan membandingkan adalah 500 dan 1.500 bp, namun urutan dalam database dapat lebih bervariasi (Clarridge, 2004).

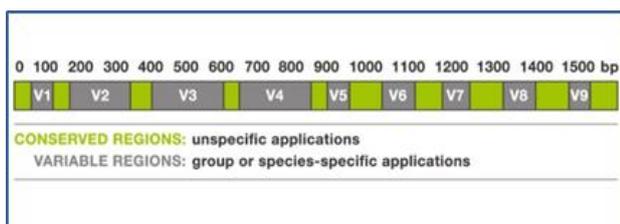
Urutan gen 16S rRNA telah ditentukan untuk sejumlah besar tingkat spesies bakteri bahkan ditingkat galur. Gen Bank, bank data terbesar untuk urutan nukleotida, memiliki lebih dari 20 juta urutan, di mana lebih dari 90.000 adalah gen 16S rRNA. Ini berarti bahwa ada banyak urutan sekuens disimpan untuk dapat dibandingkan dengan sekuens galur yang belum teridentifikasi (Clarridge, 2004).

Gen 16S rRNA bersifat universal untuk bakteri, sehingga hubungan filogeni dapat diukur antar semua spesies bakteri (Woese *et al.*, 1985). Secara umum, perbandingan urutan gen 16S rRNA memungkinkan diferensiasi antar organisme di tingkat genus pada semua filum utama bakteri dengan tujuan mengklasifikasikan galur di berbagai tingkat, termasuk dalam tingkat spesies dan sub spesies (Clarridge, 2004).



Gambar 2. Skema 16S ribosomal RNA bakteri yang menunjukkan variabel sekuens (V1-V9). Daerah variabel digunakan untuk mengkarakteristik bakteri dalam tingkat spesies dan wilayah konstan digunakan untuk menghubungkan genus. (Sumber: [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))

Hal yang juga penting untuk dipertimbangkan dalam sekuensing 16S adalah apakah perlu untuk mensekuensing keseluruhan urutan sepanjang 1.500 bp atau apakah cukup mensekuensing urutan yang lebih pendek karena hal ini sering dilaporkan dapat memberikan informasi yang sebanding. Terkadang sekuensing keseluruhan 1.500 bp perlu dilakukan untuk membedakan antar taksa atau galur tertentu (Sacchi *et al.*, 2002). Sekuensing keseluruhan juga biasanya diperlukan ketika mendeskripsikan spesies baru. Namun, bagi sebagian besar bakteri klinis, urutan sekuens awal sepanjang 500 bp dapat memberikan diferensiasi dan informasi yang memadai untuk identifikasi bahkan dapat memberikan perbedaan persen lebih besar antar galur. Secara praktis, menggunakan sekuensing sepanjang 500 bp juga lebih mudah dan murah karena memerlukan pereaksi yang tidak terlalu banyak (Clarridge, 2004).



Gambar 3. Gen 16S rRNA (Sumber : [www.alimetrics.net](http://www.alimetrics.net))

### Keistimewaan Analisis 16S rRNA

Berikut adalah beberapa keistimewaan analisis 16S rRNA untuk identifikasi bakteri yang dirangkum oleh Woo *et al.* (2008):

1. Mengidentifikasi bakteri langka dan bakteri-bakteri yang memiliki profil fenotipik yang unik.
2. Mengidentifikasi bakteri yang memiliki pertumbuhan lambat (seperti *Mycobacterium*) yang mungkin memakan waktu 6-8 minggu untuk tumbuh dalam kultur.
3. Digunakan dalam identifikasi rutin. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk membandingkan kegunaan sekuensing 16S rRNA dengan metode konvensional untuk mengidentifikasi berbagai kelompok bakteri medis penting. Secara umum, hasil sekuensing 16S rRNA memiliki persentase spesies yang teridentifikasi lebih tinggi daripada metode konvensional.
4. Berperan dalam penemuan spesies dan genus bakteri baru. Dengan menggunakan sekuens 16S rDNA, 215 spesies bakteri baru, 29 di antaranya merupakan genus baru, telah ditemukan dari spesimen manusia dalam 7 tahun terakhir dari abad ke-21 (2001-2007).
5. Mendeteksi bakteri yang tidak dapat dikultur dan mendiagnosis infeksi yang disebabkan. Pengkulturan bakteri telah menjadi teknik yang paling penting untuk mendiagnosis infeksi bakteri sejak kelahiran mikrobiologi. Teori postulat Koch mengemukakan bahwa patogen harus dapat ditumbuhkan dalam kultur murni. Pernyataan spesifik ini telah diperbarui, setelah disadari adanya bakteri yang tidak dapat dikultur namun memiliki fungsi klinis yang penting seperti *Treponema pallidum*. Di antara berbagai tes molekuler yang tersedia, sekuensing 16S rRNA menjadi teknik yang penting untuk mendeteksi bakteri yang tidak dapat dikultur. Sifatnya yang universal dan urutan gen yang konservatif memudahkan perancangan berbagai primer PCR. Karakteristik ini sangat penting dan praktis untuk mendiagnosis penyakit yang disebabkan oleh bakteri.

Keuntungan lain dari analisis 16S rRNA dalam identifikasi bakteri adalah tingkat akurasi dan keefektifan yang tinggi serta singkatnya waktu dalam proses identifikasi terlebih jika dibandingkan dengan metode konvensional (Akihary & Kolondam, 2020). Ukurannya yang besar (1.500 bp) juga dinilai menguntungkan untuk tujuan informatika (Janda & Abbott, 2007).

### Keterbatasan Penggunaan Sekuens 16S rRNA dalam Identifikasi Bakteri

Pada beberapa genus, terdapat daerah 'blindspots', di mana urutan 16S rRNA tidak memiliki perbedaan yang cukup untuk pengidentifikasian spesies tertentu. Dalam keadaan ini, target alternatif harus diteliti. Sebagai contoh, *groEL* adalah gen penting yang umum digunakan selain 16S rRNA yang berguna untuk klasifikasi dan identifikasi dari banyak kelompok bakteri, seperti *Staphylococci* dan spesies *Burkholderia* (Kwok & Chow, 2003). Sekuens 16S rRNA juga memiliki keterbatasan bagi beberapa spesies *Staphylococcus* tertentu. Oleh karena itu, urutan gen *groEL* dan *tuf* telah diusulkan sebagai metode molekuler yang lebih sesuai untuk mengidentifikasi spesies *Staphylococcus* (Heikens *et al.*, 2005).

Selain itu, jika seseorang ingin membandingkan galur untuk tujuan epidemiologi atau untuk mendeteksi galur yang memiliki faktor virulensi tertentu, analisis gen 16S rRNA juga tidak memadai karena tidak memiliki variasi yang cukup, dan wilayah ini tidak menyandikan faktor virulensi (Sacchi *et al.*, 2002).

Kekurangan lainnya adalah seperti pada metode molekuler lainnya, identifikasi menggunakan 16S rRNA tidak dapat menjamin kesamaan dalam hal fisiologi dan morfologi suatu bakteri, walaupun hasil analisis 16S rRNA nya menunjukkan keidentikan (Akihary & Kolondam, 2020). Untuk mengatasi hal seperti ini tentu metode konvensional tetap perlu dilakukan sebagai pembandingan.

### Langkah-Langkah dalam Identifikasi Menggunakan Metode 16S rRNA

Secara umum, langkah-langkah yang diperlukan dalam menganalisis daerah 16S rRNA bakteri adalah sebagai berikut:

#### 1. Ekstraksi DNA Bakteri

Terdapat beberapa metode ekstraksi DNA yang dapat digunakan untuk sekuensing 16S rRNA. Pemilihan metode ekstraksi bergantung pada sumber sampel DNA dan tingkat kemurnian yang diinginkan. Saat ini, telah banyak kit yang tersedia di pasaran untuk mencapai hasil yang efisien dan hasil yang murni dalam waktu singkat.

Untuk melepaskan DNA dari sel, membran sel harus dihancurkan terlebih dahulu. Metode umum yang digunakan pada bakteri adalah dengan menggunakan enzim lysozyme. Enzim ini memotong peptidoglikan yaitu komponen

utama dalam dinding sel bakteri. Selanjutnya, dilakukan penambahan deterjen *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) bertujuan untuk menghancurkan lapisan lemak pada membran sel (Clark & Pazdernik, 2009).

Protein merupakan pengotor utama dalam ekstraksi DNA dari bakteri dan dapat dirusak dengan menambahkan proteinase K. Fenol digunakan untuk mengekstrak protein sel. Pelarut organik ini dapat mengendapkan protein tetapi membiarkan asam nukleat (DNA dan RNA) tetap dalam larutan (Brown, 1991).

#### 2. Amplifikasi gen 16S rRNA

DNA yang telah diekstraksi digunakan sebagai cetakan untuk mengamplifikasi segmen sekitar 500 atau 1.500 bp dari urutan gen 16S rRNA menggunakan *Polymerase chain reaction* (PCR). Primer yang umum atau primer universal yang komplementer dengan daerah yang dilestarikan digunakan sehingga daerah tersebut dapat diamplifikasi dari bakteri apa saja. Produk PCR kemudian dimurnikan untuk menghilangkan kelebihan primer dan nukleotida.

#### 3. Elektroforesis

Langkah berikutnya adalah proses visualisasi gen 16S rRNA. Gen yang telah diamplifikasi, dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis gel. Visualisasi dilakukan menggunakan pewarna tertentu dan dideteksi dengan sinar UV pada UV-transiluminator (Kepel & Fatimawali, 2015). Hasil deteksi ini dapat didokumentasikan menggunakan alat khusus yang disebut *gel documentation system* (*gel-doc*).

#### 4. Sekuensing DNA

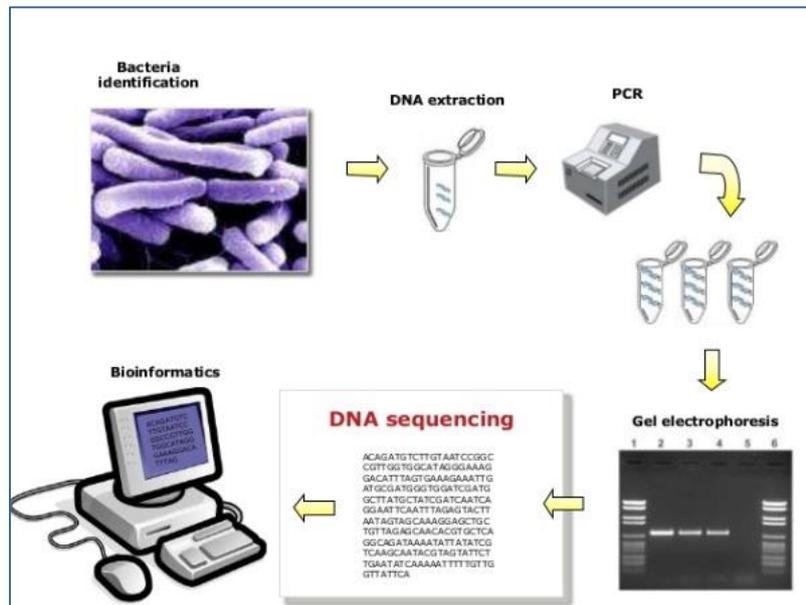
Setelah kita mengetahui panjang dari basa terminal dari setiap fragmen, urutan basa dapat ditentukan. DNA Sekuensing dapat dilakukan baik dengan Metode Sanger atau dengan menggunakan *Sequencers* DNA modern. Saat ini, ketersediaan alat di Indonesia masih sangat terbatas, sehingga biasanya untuk melakukan proses sekuensing, laboratorium/peneliti mengirimkan sampel melalui jasa sekuensing yang terdapat di luar negeri maupun laboratorium terpilih di Indonesia.

#### 5. Membandingkan Hasil Sekuensing dengan Bank Data

Hasil sekuensing kemudian digunakan untuk melakukan pencarian kemiripan sekuens dengan database yang tersedia. Teknik yang umum digunakan adalah *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan menggunakan

server online ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Sumber data lain yang bisa digunakan diantaranya adalah *Ribosomal Data-base Project (RDP-II)* (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), *Ribosomal Database Project European Molecular Biology*

*Laboratory* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), *Smart Gene IDNS* (<http://www.smartgene.ch>), dan *Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM)* (<http://www.ridom.com/>).



Gambar 3. Tahapan Identifikasi Menggunakan Metode 16S rDNA  
(Sumber: <http://www.slideshare.net/abduldvm/16s-ribosomal-dna-sequence-analysis>)

### Pedoman yang direkomendasikan untuk penggunaan sekuensing gen 16S rRNA

Terdapat beberapa rekomendasi yang sangat berguna dalam sekuensing 16S RNA saat mengidentifikasi bakteri. Rekomendasi tersebut adalah (Janda & Abbott, 2007):

1. Diperlukan informasi profil fenotip dari galur-galur khusus yang akan di sekuensing untuk mencegah terjadinya kesukaran dalam analisis data gen 16S rRNA. Untuk identifikasi galur tertentu dibutuhkan gen *housekeeping* lain contohnya *rpoB*. Beberapa galur yang membutuhkan gen housekeeping contohnya adalah: *Aeromonas veronii*, *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. globisporus*, *B. psychrophilus*, *Bordetella bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *Burkholderia cocovenenans*, *B. gladioli*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *Edwardsiella tarda*, *E. hoshinae*, *E. ictaluri*, *Enterobacter cloacae*, *Neisseria cinerea*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. jessenii*, *Streptococcus mitis*, *S. oralis*, dan *S. pneumonia*.

2. Ukuran minimum gen yang disekuensing 500-525 bp. Ukuran ideal yang disekuensing adalah 1.300-1500 bp dengan posisi ambiguitas <1%.
3. Kriteria yang digunakan dalam identifikasi spesies adalah dikatakan mirip jika tingkat kesamaan sekuens >99% atau idealnya >99,5%. Untuk kecocokan ke spesies terdekat berikutnya dengan skor jarak <0,5%, sifat lain, termasuk fenotipe, harus dipertimbangkan pada tahap akhir identifikasi spesies.

### KESIMPULAN

Metode identifikasi menggunakan 16S rRNA merupakan salah satu metode yang saat ini paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Selain cara yang relatif mudah, waktu yang cepat, teknik keberhasilan atau ketepatan dari metode ini juga menunjukkan hasil yang tinggi. Untuk sekuensing, gen yang digunakan dapat berupa gen penuh sepanjang 1500 bp maupun gen sebagian (lebih kurang 500 bp). Langkah secara umum adalah ekstraksi DNA, amplifikasi daerah 16S menggunakan PCR, visualisasi gen, sekuensing, lalu hasil sekuensing dibandingkan dengan

database yang ada. Disamping berbagai kelebihan, ternyata metode ini juga memiliki beberapa kekurangan diantaranya tidak sesuai digunakan untuk spesies tertentu.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Pemanfaatan gen 16S RNA sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *Pharmakon*, 9(1), 16–22.
- Bansal, A. K., & Meyer, T. E. (2002). Evolutionary analysis by whole genome comparisons. *J. Bacteriol*, 184, 2260–2272.
- Bottger, E. C. (1989). Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett*, 65, 171–176.
- Brown, T.A. (1991). Pengantar Kloning Gen (Muhammad, S. A & Praseno, Penerjemah). Yayasan Essentia Medica: Yogyakarta.
- Cai, H., Archambault, M., & Prescott, J. F. (2003). 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *J Vet Diagn Invest*, 15, 465–469.
- Chen, H., Hulten, K., & Clarridge III, J. E. (2002). Taxonomic sub groups of *Pasteurella multocida* relate with clinical presentation. *J. Clin. Microbiol*, 40, 3438–3441.
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2009). *Biotechnology Applying the Genetic Revolution*. Elsevier Academic Press: London.
- Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S., & Woese, C. R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci*, 74, 4537–4541.
- Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., & Fluit, A. C. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol*, 43, 2286–2290.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
- Kepel, B., & Fatimawali. (2015). Penentuan jenis dengan analisis gen 16SrRNA dan uji daya reduksi bakteri resisten merkuri yang diisolasi dari feses pasien dengan tambalan amalgam merkuri di Puskesmas Bahu Manado. *Jurnal Kedokteran YARSI*, 23(1), 45–55.
- Kwok, A. Y., & Chow, A. W. (2003). Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *In. J. Syst. Evol. Microbiol*, 53, 87–92.
- Rinanda, T. (2011). Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 11, 172–177.
- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L.W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S., & Popovic, T. (2002). Sequencing of 16SrRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis*, 8, 1117–1123.
- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Reeves, M. W., Mayer, L. W., & Popovic, T. (2002). Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular sub typing tool. *J. Clin. Microbiol*, 40, 4520–4527.
- Woese, C. R., Stackebrandt, R., Macke, T. J., & Fox, G. E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol*, 6, 143–151.