

Akankah Perkembangan Metode Deteksi Biomolekuler Era 4.0 Mampu Menggantikan Pemeriksaan Laboratorium Bakteri Secara Konvensional?

¹Khariri, ¹Novi Amalia, ¹Sundari Nursofiah, ¹Fauzul Muna, ¹Yuni Rukminiati, ¹Mursinah
¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Corresponding author : arie.tegale@gmail.com

Abstrak : Perkembangan teknologi biologi molekuler menjadi sebuah terobosan baru untuk mendeteksi sumber infeksi sehingga dapat membantu dalam proses diagnosis. Metode biologi molekuler mempunyai beberapa keunggulan diantaranya lebih sensitif, lebih spesifik, dan lebih cepat. Beberapa metode biologi molekuler untuk pemeriksaan laboratorium bakteri yang berkembang saat ini antara lain *polymerase chain reaction* (PCR), *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *finger print*, dan *restriction fraction length polymorphism* (RFLP). Meskipun lebih diunggulkan, namun salah satu keterbatasan metode ini yaitu prosedur ini sangat rentan terhadap hasil positif palsu (*false positive*) yang dapat disebabkan oleh adanya kontaminasi pada saat pengambilan spesimen, penyimpanan, transportasi atau saat melakukan pemeriksaan. Meskipun masih memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode biologi molekuler, namun teknik deteksi bakteri dengan metode konvensional masih menjadi gold standar dalam identifikasi bakteri sebagai sumber infeksi. Teknologi biologi molekuler yang semakin maju di era 4.0 belum dapat menggantikan metode konvensional.

Kata kunci : bakteri, biomolekuler, deteksi, gold standar, konvensional

Pendahuluan

Ilmu pengetahuan adalah usaha yang dilakukan manusia dalam memahami tanda dan fakta alam yang dilestarikan secara konseptual dan sistematis. Sementara teknologi merupakan usaha manusia dalam memanfaatkan bidang ilmu pengetahuan guna memenuhi kebutuhan dan kesejahteraan. Keberadaan ilmu pengetahuan dan teknologi bermanfaat untuk dapat mengatasi setiap persoalan yang dihadapi manusia. Perkembangan ilmu pengetahuan tidak dapat dipisahkan dari perkembangan teknologi, demikian pula sebaliknya. Teknologi menjadi alat utama oleh masyarakat untuk mendapatkan kesejahteraan melalui penciptaan nilai tambah. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi semakin lama semakin cepat, karena sesuatu yang dihasilkan dari suatu tahap akan menjadi dasar dan alasan bagi tahap selanjutnya. Ditinjau dari peran ekonominya teknologi merupakan pendorong utama bagi penciptaan nilai tambah ekonomis.^{1,2}

Pengembangan ilmu pengetahuan semakin bergerak maju dengan aktif meliputi berbagai bidang, diantaranya adalah bidang kesehatan. Terdapat empat bidang ilmu pengetahuan dan teknologi yang secara strategis ikut menentukan masa depan dunia dan akan berkembang dengan cepat serta mempunyai prioritas tinggi bagi umat manusia, salah satunya adalah bidang bioteknologi. Teknologi modern saat ini telah menyentuh pada berbagai aspek di masyarakat, tidak hanya untuk industri, ekonomi, sosial maupun pendidikan dan khususnya pembelajaran.³

Sebagai salah satu sumber infeksi suatu penyakit, bakteri harus dapat diisolasi pada media biakan murni, harus dapat dilakukan identifikasi, dapat mengakibatkan penyakit yang serupa bila diberikan perlakuan pada hewan percobaan, dan dapat diisolasi kembali pada media biakan murni. Perkembangan teknologi juga ikut menentukan metode yang digunakan dalam mendeteksi sumber infeksi suatu penyakit untuk kepentingan penegakkan diagnosis dan tujuan penelitian. Deteksi bakteri sebagai sumber infeksi masih berpegang pada metode isolasi pada biakan media murni dan mikroskopik yang diikuti dengan reaksi biokimia. Namun pada penggunaan teknik yang telah ada, beberapa bakteri sulit dilakukan isolasi pada media biakan murni sehingga menjadi tantangan tersendiri untuk mengembangkan metode lain untuk mengidentifikasi sumber infeksi tersebut.⁴

Perkembangan teknologi biologi molekuler menjadi sebuah terobosan baru untuk mendeteksi sumber infeksi sehingga dapat membantu dalam proses diagnosis. Metode biologi molekuler mempunyai beberapa keunggulan diantaranya lebih sensitif, lebih spesifik, dan lebih cepat. Beberapa metode biologi molekuler untuk pemeriksaan laboratorium bakteri yang berkembang saat ini antara lain *polymerase chain reaction* (PCR), *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *finger print*, dan *restriction fraction length polymorphism* (RFLP).⁵

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknologi biologi molekuler yang dapat mengamplifikasi runutan DNA atau RNA spesifik menjadi jutaan kopi yang disebut amplicon. Metode ini dapat digunakan untuk deteksi secara cepat, spesifik dan sensitif pada bakteri tertentu yang sifatnya fastidious yaitu bakteri yang sulit tumbuh dan butuh waktu lama untuk pertumbuhannya.⁶ Teknik PCR juga dapat digunakan ketika metode diagnosis lain tidak memadai, sulit dilakukan, keterbatasan waktu dan dana, serta dapat mengurangi risiko infeksi bagi staf laboratorium. Aplikasi PCR kini telah banyak dimanfaatkan untuk laboratorium mikrobiologi. Teknik PCR ini mampu melakukan uji diagnostik terhadap bakteri dengan sensitif dan spesifik serta lebih menghemat waktu dibanding uji-uji diagnostik lainnya. Metode PCR dapat mendeteksi mikroorganisme dalam jumlah kecil. Metode PCR juga mudah untuk diduplikasi dan distandarisasi.⁷ Sensitivitas dan spesifitas metode PCR dalam deteksi sampel dapat dipakai untuk studi epidemiologi dan taksonomi bakteri.⁸

Komponen dalam proses PCR terdiri dari: 1) templat DNA, 2) sepasang primer yang merupakan suatu oligonukleotida pendek dengan urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat, 3) dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates), 4) buffer PCR, 5) magnesium klorida (MgCl₂) dan 6) enzim polimerase DNA. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: 1) pra-denaturasi DNA templat, 2) denaturasi DNA templat 3) penempelan primer pada templat (*annealing*), 4) pemanjangan primer (*extension*) dan 5) pemantapan (*postextension*). Tahap denaturasi DNA templat sampai pemanjangan primer (*extension*) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA.⁹

Saat ini penggunaan metode PCR telah banyak dikembangkan dan diaplikasikan untuk diagnosis berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Metode ini sederhana dan efisien untuk deteksi bakteri, namun efisiensinya bergantung pada spesifitas primer yang dipakai.¹⁰ Saat ini, sensitivitas dan spesifitas pengujian dengan metode PCR terus mengalami peningkatan melalui pengembangan dan modifikasi uji sehingga berkembang teknik PCR standar yang terdiri dari PCR konvensional dan PCR real time (*quantitative PCR*), PCR multiplex, dan *nested PCR*.¹¹

Pada metode PCR standar, primer yang digunakan biasanya hanya satu pasang. Pada sepasang primer tersebut ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Setiap primer melengkapi untaian tunggal yang berbeda dari target untaian ganda. Untuk mendapatkan skrining sekuen yang potensial dan homolog, pembuatan desain primer dapat memanfaatkan perangkat lunak seperti Oligo (National Biosciences, Plymouth, NC) atau situs pencarian online seperti BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).¹²

Metode PCR standar dibedakan menjadi dua yaitu PCR konvensional dan real time. Pembacaan hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan analisis pada agar elektroforesis. Sedangkan PCR real time, jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur di setiap siklus proses PCR.¹³

Metode PCR real time berdasarkan fluoresensi sering digunakan untuk deteksi RNA, DNA dan cDNA karena sangat sensitif untuk amplifikasi secara bersama-sama serta dapat mengetahui kuantitas sekuens asam nukleat. Selain sensitivitas lebih tinggi, PCR real time juga lebih dinamis, risiko kontaminasi silang lebih sedikit, dan digunakan lebih banyak untuk pemeriksaan. Metode PCR real time mampu mendeteksi lebih cepat, metode lebih sederhana dan sensitif, tidak memerlukan teknik lanjutan dengan elektroforesis sehingga mengurangi terjadinya kontaminasi di laboratorium dan reaksi positif palsu. Metode ini tepat digunakan untuk berbagai aplikasi seperti analisis ekspresi gen, penentuan jumlah virus, deteksi

organisme yang mengalami mutasi genetik, diskriminasi alel dan genotipe single nucleotide polymorphisms (SNP). Penambahan probe yang spesifik dapat meningkatkan spesifisitas pada proses PCR real time jika dibandingkan dengan PCR konvensional. Namun demikian, PCR real time juga mempunyai kelemahan yaitu memerlukan peralatan dan reagen yang mahal serta pemahaman teknik yang benar untuk hasil yang akurat.¹⁴

Metode PCR multiplex merupakan perkembangan lebih lanjut dari metode PCR. Metode ini dapat mengamplifikasi beberapa target dalam satu reaksi menggunakan lebih dari satu pasang primer. Susunan primer yang digunakan harus dioptimalkan sehingga semua primer dapat bekerja pada suhu yang sama selama PCR. Kelebihan metode PCR multiplex ini adalah dalam satu kali proses reaksi dapat mendeteksi banyak patogen. Teknik PCR multiplex lebih kompleks dibandingkan dengan metode PCR standar. Metode PCR multiplex mengacu pada penggunaan reaksi berantai polimerase untuk memperkuat beberapa sekuens DNA yang berbeda secara bersamaan. Metode PCR multiplex berpotensi untuk menghemat waktu dan upaya dalam prosedur pemeriksaan tanpa mengurangi fungsi pemeriksaan.¹⁵

Meskipun lebih diunggulkan, namun salah satu keterbatasan metode ini yaitu prosedur ini sangat rentan terhadap hasil positif palsu (*false positive*) yang dapat disebabkan oleh adanya kontaminasi pada saat pengambilan spesimen, penyimpanan, transportasi atau saat melakukan pemeriksaan. Keterbatasan ini dapat diminimalisasi dengan penerapan prosedur operasional baku yang benar, melakukan optimalisasi dan validasi protokol, serta mematuhi prosedur pengendalian kualitas yang baku. Teknologi PCR semakin berkembang baik dari metode, perangkat mesin maupun reagensia pendukungnya, sehingga menjadikan metode PCR sebagai *gold standard* terbaru untuk mendeteksi berbagai bakteri di tingkat molekuler.¹⁶

Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)

Metode Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) merupakan metode yang dapat mengamplifikasi DNA untai ganda pada kondisi isothermal dengan alat sederhana. Kondisi isothermal dimungkinkan karena pada suhu sekitar 65°C, DNA untai ganda berada dalam kesetimbangan dinamis sehingga memungkinkan salah satu primer untuk berhibridisasi dengan sekuens komplementernya, lalu menginisiasi terjadinya sintesis DNA. Metode ini merupakan metode amplifikasi DNA yang simpel, cepat dan spesifik. Metode ini sangat menjanjikan sebagai alat diagnosis karena banyak keunggulannya dibandingkan dengan metode amplifikasi gen lainnya seperti PCR atau RTPCR karena proses amplifikasi dan deteksi gen dapat dilakukan hanya dalam satu suhu (63°C). Metode LAMP banyak diaplikasikan untuk mendeteksi berbagai macam bakteri patogen seperti *Mycobacterium tuberculosis* dan *Salmonella*.¹⁸⁻²⁰

Beberapa kelebihan metode LAMP antara lain: 1) memanfaatkan suhu tetap dan dapat dilakukan dengan penangas air dan atau pelat pemanas (*heating block*), 2) teknik pemeriksaan dan pengamatan hasil mudah dan sederhana, 3) mempunyai spesifisitas tinggi dengan menggunakan 4 atau 6 primer sehingga dapat mengenali 6 atau 8 sekuens nukleotida yang berbeda, 4) membutuhkan waktu yang cepat sekitar 30 sampai 60 menit (4-5 jam untuk PCR, dari awal amplifikasi sampai hasil analisis), dan 5) mempunyai sensitivitas sangat tinggi karena mampu mengamplifikasi DNA 10⁹ hingga 10¹⁰ kali dalam waktu 15 menit sampai 60 menit. Amplifikasi dapat dideteksi melalui keberadaan produk amplifikasi. Visualisasi produk LAMP dapat dilakukan dengan melihat adanya endapan putih pada reaksi LAMP positif (presipitat garam magnesium piropospat) dengan penambahan fluoresence detection reagent (FDR) atau syber green dan juga dengan elektroforesis gel dimana hasil visualisasi teknik LAMP seperti anak tangga.²¹⁻²²

Finger printing

Metode DNA fingerprint merupakan teknik untuk identifikasi berdasarkan pada profil DNA. DNA fingerprint yang merupakan gambaran pola potongan DNA karena setiap spesies mempunyai DNA fingerprint yang berbeda. Pada pemeriksaan bakteriologi, beberapa metode finger printing mampu membedakan isolat dalam biovar yang sama dengan spesies tertentu dengan adanya polimorfisme nukleotida tunggal, yang mendeteksi perbedaan nukleotida tunggal dalam urutan DNA anggota suatu spesies. Pengembangan finger printing didasarkan pada teknik PCR yang mampu untuk diskriminasi antar spesies.²³

Restriction Fraction Length Polymorphism (RFLP)

Metode Restriction Fraction Length Polymorphism (RFLP) FLP merupakan perbedaan pada homolog urutan DNA yang dapat dideteksi dengan menggunakan adanya perbedaan fragmen DNA yang telah dipotong dengan menggunakan enzim endonuklease tertentu. Metode ini digunakan sebagai penanda molekuler karena spesifik untuk setiap tunggal atau kombinasi dari enzim restriksi. Metode RFLP banyak digunakan untuk pemetaan genom, genome typing, tes paternitas, forensic dan diagnostik hereditas penyakit. Tahapan metode pemeriksaan dengan RFLP meliputi 4 tahapan yaitu, isolasi DNA, pemotangan DNA dengan enzim restriksi endonuklease, elektroforesi hasil pemotangan DNA dan southern blot.^{24,25}

Perbandingan Teknologi Biomolekuler dan Konvensional

Pemeriksaan bakteri secara konvensional ditetapkan dengan biakan pada media murni, mikroskopik dan reaksi biokimia. Metode konvensional dengan medium kultur merupakan baku emas dalam mendiagnosa bakteri sebagai sumber infeksi. Pemeriksaan dengan medium kultur mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi, akan tetapi proses pemeriksaan memerlukan waktu yang cukup lama.²⁶ Sensitivitas metode tersebut mendekati 100% dan pemeriksaan dapat dilakukan terhadap sampel klinis yang mempunyai kandungan bakteri 10-100 sel. Meskipun metode kultur sebagai metode konvensional merupakan metode baku emas, namun metode konvensional memiliki beberapa kekurangan salah satunya adalah identifikasinya memerlukan waktu yang lebih lama yaitu 2–3 hari. Selain itu, jumlah bakteri yang sangat sedikit dapat menyebabkan sulit atau tidak bisa untuk dilakukan kultur. Metode konvensional juga harus dilakukan oleh tenaga laboratorium yang sudah terlatih dan hal lain yang menjadi kendala adalah umumnya tidak tersedianya fasilitas laboratorium mikrobiologi pada kasus kejadian luar biasa kolera.²⁷

Metode biologi molekuler semakin berkembang dan mempunyai berbagai keunggulan dibanding metode konvensional. Waktu yang diperlukan untuk proses pemeriksaan. Selain itu, metode tersebut merupakan metode yang sensitif dan spesifik apabila dibandingkan dengan metode konvensional yang merupakan metode baku emas (gold standard) pada identifikasi bakteri. Metode identifikasi dengan menggunakan teknik PCR memerlukan waktu cukup sehari untuk identifikasi bakteri penyebab infeksi. Berbeda halnya dengan metode pemeriksaan secara konvensional yang harus membutuhkan waktu yang lebih dari satu hari untuk dapat mengetahui hasilnya. Namun bila dibandingkan dengan metode konvensional, metode biologi molekuler memerlukan biaya dan peralatan yang cukup mahal.^{28,29}

Kesimpulan

Meskipun masih memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode biologi molekuler, namun teknik deteksi bakteri dengan metode konvensional masih menjadi gold standar dalam identifikasi bakteri sebagai sumber infeksi. Teknologi biologi molekuler yang semakin maju di era 4.0 belum dapat menggantikan metode konvensional.

Daftar Pustaka

- [1] Alan Januszewski, 2001, Educational Technology : The Development of a Concept, Librarian unlimited.Inc.
- [2] Cepi Riyana, 2004, Strategi implementasi Teknologi Informasi dan Komunikasi dengan menerapkan Konsep Instructional Technology, Jurnal Edutech, Jurusan Kurtek Bandung.
- [3] Nasution MKM. Basis Sains dan Teknologi sebagai Basis Perekonomian. Suara USU. 2001; 24(13): 11
- [4] Alexander B, Wolfgang M, Harald, Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71: 3624.
- [5] Noor SM. Teknik Molekuler Amplifikasi DNA untuk Deteksi Brucellosis pada Sapi. Wartazoa. 2018; 8(2): 81-88.
- [6] Khamesipour F, Doosti A, Taheri H. Molecular detection of Brucella spp in the semen, testis and blood samples of cattle and sheep. J Pure Appl Microbiol. 2013; 7:495-500.
- [7] Noor SM, Sudarmono PP, Kusumawati A, Karuniawati A. Deteksi Brucellosis pada susu sapi dengan uji polymerase chain reaction (PCR). J Kedokteran Hewan. 2015; 9:64-66.

- [8] Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL. Diagnosis of Brucellosis. *Open Vet Sci J.* 2010; 4:46.
- [9] Handoyo D, Rudiretna A. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 200; 9(1): 17-29.
- [10] JHuber B, Scholz HC, Lucero N, Busse HJ. Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *Int J Med Microbiol.* 2009; 299:563-573.
- [11] Habtamu TT, Rathore R, Dhama K, Karthik K. Isolation and molecular detection of *Brucella melitensis* from disease outbreak in sheep and *Brucella abortus* from cattle farm by 711 and omp2a gene based PCR. *J Curr Res.* 2013.5:1920-1925.
- [12] 13.Himawan A, Sumardiyono YB, Somowiyarjo S, Trisyono YA, Beattie A. Deteksi Menggunakan PCR (Polymerase Chain Reaction) *Candidatus Liberibacter Asiaticus*, Penyebab Huanglongbing pada Jeruk Siem dengan Beberapa Tipe Gejala pada Daun. *J. HPT Tropika.* 2010; 10(2): 178-183.
- [13] Kurniawan E, Raveinal, Fauzar, Arsyad Z. Nilai Diagnostik Metode “Real Time” PCR GeneXpert pada TB Paru BTA Negatif. *Jurnal Kesehatan Andalas.* 2016; 5(3): 730-738.
- [14] Perkembangan Teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases. Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. *Wartazoa.* 2014; 24(1).
- [15] Smirnova AE, Varsin A V, Sandybaev TN, Klotchenko AS, Plotnikova AM, Chervyakova VO, Ransyrbay RA, Kiselev IO. 2013. Current methods of human and animal Brucellosis diagnostics. *Adv Infect Dis.* 3:177-184.
- [16] Rosilawati ML, Sudarmono P, Ibrahim F. Sensitivitas metode PCR (Polymerase chain reaction) dalam mendeteksi isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*. *J Kedokteran Trisakti.* 2002; 21(1).
- [17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12):63.
- [18] Adhikari S. Prevalence of Brucellosis in goats of Dang Districts, Nepal. In: Joshi BR, Singh UM, Paudel KP, Thakuri KC, Shrestha SP, Jha VC, editors. *Vet Safeguarding Anim Hum Environ.* Kathmandu, 28-30 March 2012. Kathmandu (Nepal): Nepal Veterinary Association
- [19] Hutapea H, Retnoningrum D, Rahman E, Rostinawati T. Teknik Long Polymerase Chain Reaction (LPCR) untuk Perbanyak Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Polimerase Virus Hepatitis B. *Plasma.* 2015; 1(2): 45-52.
- [20] Deguo K, Toubiana M, Hartati S, Kusumawati A, Dubremetz J, Widada J. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. *Vet Parasitol.* 2008; 162:327-331.
- [21] Song T, Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 243:259-263.
- [22] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289:150154.
- [23] Al Dahouk S, Hagen RM, Nöckler K, Tomaso H, Wittig M, Scholz HC, Vergnaud G, Neubauer H.. Failure of a short-term antibiotic therapy for human Brucellosis using ciprofloxacin: A study on in vitro susceptibility of *Brucella* strains. *Chemotherapy.* 2005; 511:352-356.
- [24] García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Vizmanos JL, López-Goñi I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem.* 2006; 52:779-781.
- [25] De Santis R, Ciammaruconi A, Pomponi A, Fillo S, Lista F. *Brucella*: Molecular diagnostic techniques in response to bioterrorism threat. *J Bioterr Biodef.* 2011:1-8.
- [26] Khariri. Diagnosa *Vibrio Cholerae* dengan Metode Kultur dan Polimerase Chain Reaction (PCR) pada Sampel Sumber Air Minum. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia.* 2013; 2(2): 51-58.

- [27] Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, Glushkevich T, Vuopio-Varkila J, and Popovic T. Current Approaches to the Laboratory Diagnosis of Diphtheria. *JID*. 2000;181(Suppl 1):S138–45. 15
- [28] Arunrut N, Suebsing R, Withyachumnarnkul B, Kiatpathomchai W. Demonstration of a very inexpensive, turbidimetric, real-time, RT-LAMP detection platform using shrimp Laem-Singh virus (LSNV) as a model. *PLoS One*. 2014;9(9):e108047.
- [29] Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;32 (12):e103.