

EVALUASI TIGA METODE IDENTIFIKASI BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS SCIURI* DARI PINDANG TONGKOL (*EUTHYNNUS AFFINIS*)

Purwaningtyas Kusumaningsih^{1*}, I Gede Mustika²

^{1,2}Program Studi Ilmu Gizi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Sains dan Teknologi, Universitas Dhyana Pura

Email: purwak.05@undhirabali.ac.id^{1*}

ABSTRAK

Metode identifikasi merupakan salah satu tombak utama dalam penegakan diagnosis. Beberapa metode telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitifitas dan kemampuan spesifikasinya dalam mengidentifikasi mikroorganisme. Kombinasi beberapa metode digunakan bertujuan untuk meminimalisir kesalahan dalam proses identifikasi. Pada penelitian ini dilakukan evaluasi terhadap tiga metode identifikasi bakteri yaitu pewarnaan gram, uji biokimia dan uji molekuler. Tujuan dari penelitian lanjutan ini untuk melihat kemampuan ketiga metode tersebut dalam mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus sciuri* dari sampel Pindang tongkol (*Euthynnus affinis*). Hasil penelitian ini diperoleh bahwa ketiga metode dapat saling mendukung ketepatan identifikasi bakteri *Staphylococcus*. Identifikasi pewarnaan gram dapat membedakan bakteri cocci golongan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*, tetapi belum mampu menentukan golongan virulensi bakteri. Uji biokimia dengan kit StaphaurexTM menunjukkan sensitif dalam membedakan antara *Coagulase-negative Staphylococcus* (CoNS) dan *Coagulase-positive Staphylococcus* (CoPS), secara general dan tingkat virulensi. Uji molekuler memberikan hasil yang spesifik identitas sampel sebagai *Staphylococcus sciuri*. Ketiga metode pewarnaan dan uji biokimia mampu mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus sp.* dan uji molekuler diketahui mampu mengidentifikasi *Staphylococcus sciuri*. Bakteri *S. sciuri* dapat ditemukan dalam feses ikan, merupakan flora normal di permukaan kulit, mampu menyebabkan penyakit zoonosis dan merupakan indikator pencemaran lingkungan.

Kata kunci: Diagnosis, identifikasi bakteri, *Staphylococcus sp.*

1. Pendahuluan

Proses identifikasi bakteri memerlukan tingkat keakuratan yang tinggi bertujuan untuk menghindari terjadinya kesalahan identifikasi (Yeung & Thorsen, 2016). Beberapa metode identifikasi bakteri telah banyak dikembangkan dan menawarkan tingkat sensitifitas dan spesifikasi yang tinggi. Dimulai dari media selektif, uji biokimia, pewarnaan gram dan yang terakhir uji biomolekuler. Masing-masing metode memiliki keunggulan masing-masing, tapi yang terpenting bisa digunakan dalam waktu seefisien mungkin. Efisien dan ketepatan identifikasi sangat mempengaruhi penegakan diagnosis penyakit (Vira et al., 2016) yang disebabkan oleh bakteri, penentuan patogen dan non-patogen suatu bakteri, ketepatan dalam penanganan wabah penyakit. Dapat mendukung dalam mengetahui sumber kontaminasi atau pencemaran dan pencegahan selanjutnya supaya bakteri dapat dikendalikan serta mencegah terjadinya wabah penyakit (Gülaydin & Öztürk, 2019).

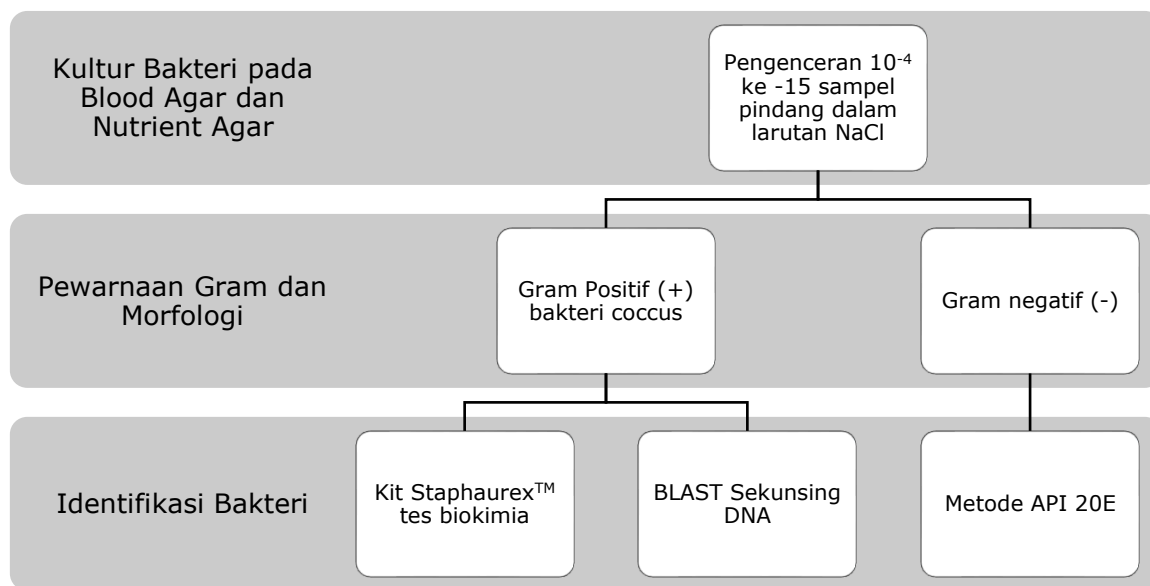
Pada penelitian ini akan membandingkan tiga metode yang digunakan dalam identifikasi sampel koloni bakteri khususnya bakteri cocci gram positif dengan metode konvensional berupa pengecatan gram dan rapid tes menggunakan kit StaphaurexTM. Keduanya dibandingkan dengan metode molekuler sekuensing DNA. Ketiga metode ini dapat mengidentifikasi berdasarkan morfologi, biokimia dan molekuler. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui apakah ketiga metode ini dapat dipakai sebagai metode dalam identifikasi bakteri cocci. Apakah ketiga metode ini dapat dipakai secara tunggal

dalam proses identifikasi bakteri atau digunakan secara kombinasi dalam mendukung penegakan diagnosis bakteri secara sensitive dan spesifik.

Ketepatan masing-masing metode tersebut dalam mengidentifikasi bakteri berasal dari pandang tongkol (*Euthynnus affinis*) diharapkan dapat memberikan informasi dalam spesies bakteri, menentukan asal pencemaran bakteri, sifat virulensi bakteri, pencegahan kontaminasi bakteri dan tindakan penanganan di konsumen sebagai pencegahan infeksi penyakit (Vithanage et al., 2014); (Gülaydin & Öztürk, 2019).

2. Metode

Penelitian ini menggunakan metode penelitian deskriptif kualitatif. Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Fakultas Kedokteran, Universitas Dhyana Pura. Pada kedua laboratorium tersebut dilakukan kultur bakteri dan isolasi DNA bakteri. Hasil sekuensing DNA dilakukan pada PT. Genetik di Jakarta. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Alur Penelitian Identifikasi Bakteri Pindang Tongkol (*Euthynnus affinis*)

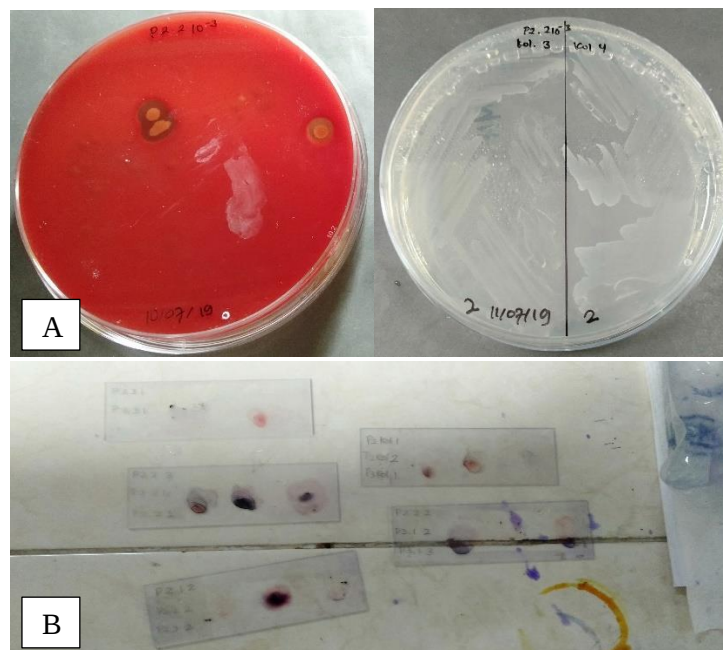
Pada penelitian ini dilakukan kulturisasi bakteri dari lima belas sampel pindang tongkol (*Euthynnus affinis*) yang dibeli di pedagang pindang di pasar Kota Semarapura Klungkung. Kelima belas sampel dibawa ke laboratorium Mikrobiologi, fakultas kedokteran Udayana untuk kulturisasi bakteri. Setiap sampel diambil 1 gram dari daerah insang, permukaan kulit, daging dan perut pindang. Kemudian masing-masing sampel dilakukan pengenceran sebanyak 1:10000 dalam larutan NaCl. Pada pengenceran 10^{-4} diambil sebanyak 10 μ l dan ditanam pada *Blood Agar* dengan metode *spread*. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Langkah selanjutnya dilakukan pengamatan pada koloni yang tumbuh pada *Blood Agar* dari segi morfologi. Kemudian dipilih 15 koloni bakteri yang berbeda dan tumbuh tunggal. Rekulturisasi dilakukan pada *Nutrient Agar* supaya mendapatkan isolat murni yang akan dilanjutkan dengan pewarnaan gram. Apabila hasil pengecatan menunjukkan gram positif dan secara morfologi termasuk bakteri cocci *cluster* (bergerombol) akan dilanjutkan dengan rapid test Staphaurex™ (Andriesse et al., 2011) dan sekuensing DNA dengan sistem BLAST di *Nucleotide Center for Biotechnology Information* (NCBI) sebagai metode pembandingan dalam proses identifikasi (Johnson et al., 2019). Bakteri yang masuk golongan bakteri gram negatif selanjutnya dipisahkan dan akan diidentifikasi dengan metode yang berbeda.

Hasil data pewarnaan gram, morfologi, reaksi biokimia dari kit Staphaurex™ dan sekuensing DNA akan dianalisis secara kualitatif berdasarkan fenomena yang ditemukan selama penelitian berlangsung.

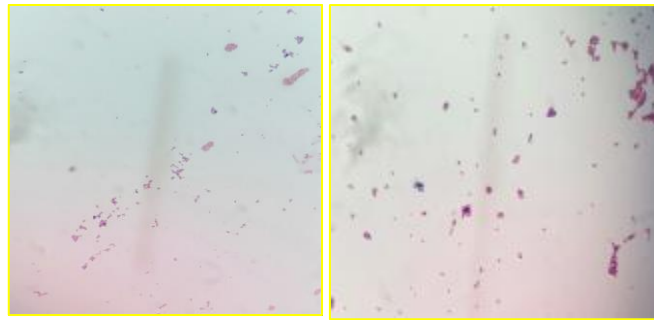
3. Hasil dan Pembahasan

Kultur bakteri pada *Blood Agar* ditemukan ada 15 koloni yang berbeda berdasarkan morfologi koloni. Kemudian dari ke-15 koloni bakteri tersebut dilanjutkan dengan rekultur pada *Nutrient Agar* untuk mendapatkan isolat murni. Penanaman pada *Blood Agar* dan *Nutrient Agar* dapat dilihat pada Gambar 2. *Blood Agar* dan *Nutrient Agar* dipilih sebagai media karena memiliki nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhan bakteri secara umum dan tidak bersifat spesifik. Semua spesies bakteri dapat tumbuh dengan subur pada kedua media ini (Tagliavia et al., 2019).



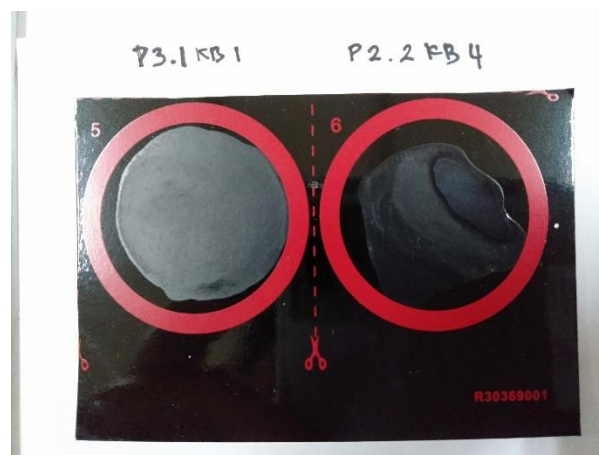
Gambar 2. A. Kultur bakteri sampel P2 pada *Blood* dan *Nutrient* agar.
B. Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan gram pada kelima belas koloni bakteri diperoleh hasil terdapat 2 bakteri gram positif yang secara morfologi adalah bakteri cocci gram positif (Gambar 3.), dinamakan sampel P3 dan P2. Pada kedua sampel bakteri tersebut bentuk susunan morfologinya bergerombol (*cluster*) dan bukan rantai (*chains*), sehingga dapat disimpulkan kedalam golongan bakteri *Staphylococcus* gram positif dan bukan *Streptococcus* gram positif (Thairu et al., 2014), tetapi belum mampu menentukan sifat virulensi bakteri (Beims et al., 2016). Oleh karena itu, dapat dilanjutkan dengan proses identifikasi menggunakan kit Staphaurex™ yang mendasarkan penggolongan bakteri *Staphylococcus* berdasarkan kemampuan biokimia bakteri. Sampel bakteri lain yang secara pewarnaan termasuk gram negatif dan morfologinya masuk kedalam bakteri basil maupun cocci dilanjutkan dengan menggunakan tes biokimia yang lain yaitu kit API 20E. Salah satu contoh bakteri cocci gram negatif yaitu *Neisseria spp.* (Diallo et al., 2019).



Gambar 3. Bakteri *Staphylococcus* (P2 dan P3) dicirikan dengan bentuk *cluster* dan gram positif. (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

Setelah dilakukan tes menggunakan Staphaurex™ pada kedua bakteri, menunjukkan keduanya hasil katalasenya (+) dan koagulase (-). Kedua hasil tersebut dapat digolongkan sebagai bakteri *Staphylococcus epidermis/capitis* atas petunjuk penjelasan di kit tersebut. Uji katalase (+) berarti bakteri *Staphylococcus* pada sampel ini menghasilkan enzim katalase yang berguna untuk metabolisme hydrogen peroksida (H_2O_2) untuk menghasilkan oksigen (O_2) dan air (H_2O) dicirikan dengan terbentuknya gelembung udara (Dezfulian et al., 2010). Bakteri cocci gram positif bila dilihat dari uji katalase dapat dibagi menjadi 2 kelas yaitu yang memproduksi enzim katalase dan tidak. *Staphylococcus* sp., hal ini sesuai dengan hasil morfologi yang dilihat saat pewarnaan gram yaitu cocci berbentuk *cluster* atau bergerombol sedangkan bakteri *Streptococcus* sp. yang koloninya berbentuk *chains* atau rantai termasuk tidak memproduksi enzim katalase. Saat ditest pada kedua sampel bakteri dihasilkan gelembung udara, hal ini tidak akan terjadi apabila bakteri tersebut *Streptococcus*. Berarti memang bakteri pada kedua sampel tersebut adalah *Staphylococcus*. Namun secara umum bakteri *Staphylococcus* sp., ada yang bersifat aerob dan fakultatif anaerob (Khalil et al., 2014); (Sergelidis et al., 2014).



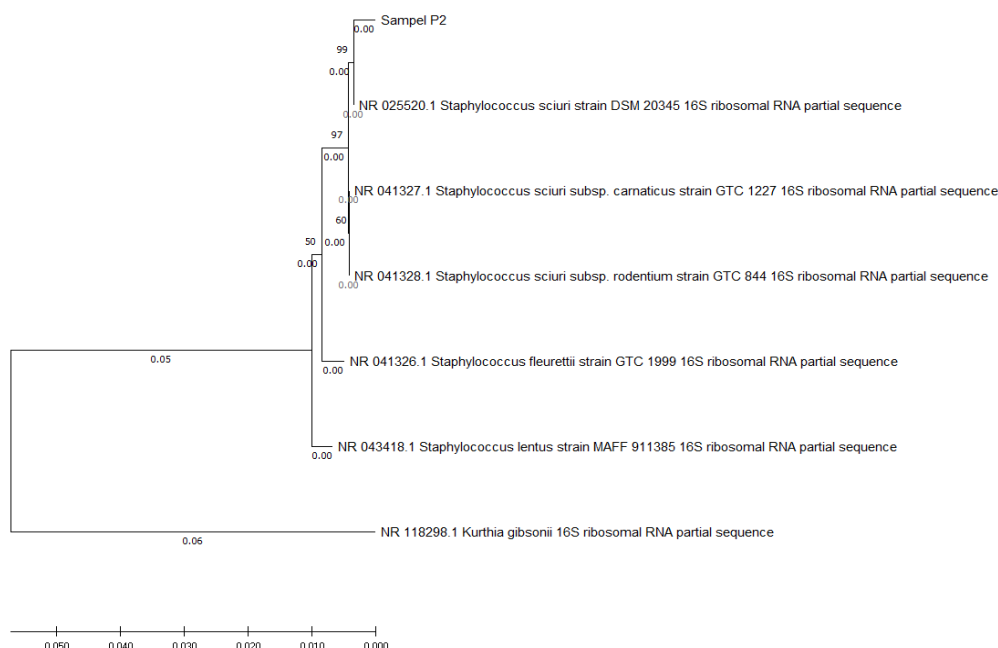
Gambar 4. Hasil tes Staphaurex™ sampel P3 dan P2 tidak ada aglutinasi

Koagulase tidak terjadi pada kedua sampel bakteri pada penelitian ini (Gambar 4.). Hasil ini dapat menjelaskan bahwa bakteri *Staphylococcus* pada sampel bakteri ini termasuk kedalam golongan *Coagulase-negative Staphylococcus* (CoNS) karena tidak memiliki protein A yang mampu mengaglutinasi pada plasma spesifik Imunoglobulin G (IgG) (Becker et al., 2014). Pada bakteri golongan *Staphylococcus* sp., hanya *S. aureus* yang memproduksi protein A dan memiliki kemampuan aglutinasi plasma khususnya IgG disebut *Coagulase-positive Staphylococcus* (CoPS). Akan tetapi tidak seperti *S. epidermis*, *S. capitis*, *S. sciuri* dan *S. haemolyticus* yang tidak memiliki kemampuan aglutinasi.

Bakteri yang teridentifikasi menurut hasil Staphaurex™ bukan *S. aureus* (Crosby et al., 2016).

Sebagai pembandingan untuk mengetahui secara spesifik apakah bakteri sampel tersebut memang *S. epidermis* atau *S. capitis* atau bisa saja spesies *Staphylococcus* lain yang termasuk tidak menghasilkan protein A, dikarenakan banyak spesiesnya. Maka dilanjutkan dengan sekunsing DNA memakai primer 16S rRNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Setelah dirunning pada elektroforesis gel diperoleh hanya sampel P2 yang terbentuk pita DNA. Sampel P2 dilanjutkan identifikasi biomolekuler dengan mem-BLAST sekuensing DNA tersebut di gen Bank. Pada Gambar 5. hasil BLAST DNA 99,32% identik dengan *S. sciuri* dan dari analisis pohon filogenetik jarak genetik DNA sampel P2 dengan DNA *S. sciuri* strain DSM 20345 pada NCBI adalah 0.00, sangat identik. Dimana karakteristik biokimianya sama dengan *S. epidermis* dan *S. capitis* yaitu menghasilkan enzim katalase dan tidak memproduksi protein A (Becker et al., 2014).

Pada penelitian ini hasil identifikasi bakteri menggunakan rapid tes Staphaurex™ diketahui sensitif membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* berdasarkan uji katalase. Uji koagulase sensitive membedakan antara *S. aureus* dengan *Staphylococcus* sp. golongan CoNS. Hal ini sudah cukup apabila sebatas mengetahui apakah sampel bakteri cocci yang kita temukan di lapangan dapat diidentifikasi sebagai *S. aureus* atau bukan, meskipun yang tidak mampu mengaglutinasi plasma tidak hanya *S. epidermis/capitis*. Melalui hasil yang ditunjukkan cukup mampu mengetahui tingkat virulensi cemaran bakteri *Staphylococcus* asal makanan dan tindakan selanjutnya untuk mengatasi masalah yang dapat ditimbulkan dari cemaran bakteri *Staphylococcus* tersebut (Mama et al., 2019). Lebih jauh lagi untuk mengetahui identifikasi bakteri yang spesifik, terutama sumber kontaminasi bakteri berasal tetap metode molekuler lebih spesifik. Karena metode ini dapat langsung memberikan hasil indentifikasi yang terarah kepada satu jenis spesies berdasarkan identitas DNA (Vira et al., 2016).



Gambar 5. Pohon filogenetik sampel P2 identik dengan DNA *S. sciuri* strain DSM 20345

Staphylococcus yang ditemukan pada penelitian ini apabila diambil dari identifikasi molekuler yaitu *S. sciuri* memang beberapa penelitian menemukan bakteri ini dapat ditemukan pada penyakit kulit seperti dermatitis pada manusia, anak babi, luka pada kuda dan feses ikan kerapu (Beims et al., 2016); (Kengkoom & Ampawong, 2017); (Besung et al., 2019). Spesies *S. sciuri* dapat menimbulkan penyakit zoonosis apabila tertelan dari olahan makanan yang tercemar (Mama et al., 2019). Namun oleh (Stepanović et al., 2001) menemukan bahwa *S. sciuri* merupakan bakteri flora normal pada kulit, saluran pernafasan dan mulut. Pencemaran *S. sciuri* dapat bersumber dari lingkungan yang tercemar kotoran hewan liar dan manusia, penyakit dari manusia yang mengolah makanan laut dan air yang digunakan dalam pengolahan (Ahayo et al., 2013); (Contreras-Rodriguez et al., 2019). Pencegahan yang dapat dilakukan adalah dengan mengolah kembali makanan olahan laut dengan suhu minimal 70°C serta penerapan hygiene sanitasi diri saat mengolah makanan laut dan lingkungan sekitar pengolahan makanan laut (De Jong et al., 2012); (Sipahutar et al., 2017).

4. Simpulan

Pemeriksaan bakteri dengan pewarnaan hanya dapat menentukan sampel P2 dan P3 kedalam golongan gram positif *Staphylococcus* dan bentuk koloni bakteri sampel kedalam bakteri cocci bergerombol (*cluster*) gram. Rapid test menggunakan Staphaurex™ berdasarkan sifat biokimia dapat diidentifikasi sebagai *S. epidermis/capitis*. Identifikasi secara molekuler lebih mendapatkan hasil indentifikasi lebih spesifik yaitu *S. sciuri* yang memiliki sifat biokimia yang sama dengan *S. epidermis/capitis*. Sampel DNA P2 identik 99, 32% dengan DNA *S. sciuri* strain DSM 20345 pada data gen Bank di *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) dengan jarak genetik 0,00 berdasarkan analisis pohon filogenetik. *Staphylococcus sciuri* ditemukan dalam feses ikan, dapat berupa bakteri flora normal pada kulit, indikator tingkat cemaran lingkungan dan penyebab penyakit zoonosis.

5. Daftar Rujukan

- Ahayo, T., Pazou E, Y., Moussa, B. L., Gbohou A, A., Bocco, M., Dramane, K., & Aminou, T. (2013). *Staphylococcus sciuri* outbreak at Tertiary Hospital in Benin. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 02(03), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2161-0703.1000126>.
- Andriesse, G. I., Elberts, S., Vrolijk, A., Verhulst, C., & Kluytmans, J. A. J. W. (2011). Evaluation of a fourth-generation latex agglutination test for the identification of *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30(2), 259–264. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1080-2>.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>.
- Beims, H., Overmann, A., Fulde, M., Steinert, M., & Bergmann, S. (2016). Isolation of *staphylococcus sciuri* from horse skin infection. *Open Veterinary Journal*, 6(3), 242–246. <https://doi.org/10.4314/ovj.v6i3.14>.
- Besung, I. N. K., Agustiani, N. K. E., & Mahardika, I. G. N. K. (2019). Identifikasi *Staphylococcus sciuri* dan *S. hominis* pada Ikan Kerapu di Pasar Ikan Kedonganan dengan Analisis Sekuen 16S rRNA. *Jurnal Veteriner*, 20(3), 345. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.3.345>.
- Contreras-Rodriguez, A., Aguilera-Arreola, M. G., Osorio, A. R., Martin, M. D., Guzmán, R. L., Velarde, E., & Ruiz, E. A. (2019). Detection of potential human pathogenic bacteria isolated from feces of two colonial seabirds nesting on isla rasa, gulf of california: Heermann's gull (*larus heermanni*) and elegant tern (*thalasseus elegans*). *Tropical Conservation Science*, 12, 1–8. <https://doi.org/10.1177/1940082919855673>.
- Crosby, H. A., Kwiecinski, J., & Horswill, A. R. (2016). *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host-pathogen interactions. *Adv Appl Microbiol.*, 96(41), 1–33.

- <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.07.018>. *Staphylococcus*.
- De Jong, A. E. I., Van Asselt, E. D., Zwietering, M. H., Nauta, M. J., & De Jonge, R. (2012). Extreme heat resistance of food borne pathogens campylobacter jejuni, escherichia coli, and salmonella typhimurium on chicken breast fillet during cooking. *International Journal of Microbiology*, 2012(1), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/196841>.
- Dezfulian, A., Salehian, M. T., Amini, V., Dabiri, H., Azimirad, M., Aslani, M. M., Zali, M. R., & Fazel, I. (2010). Catalase-negative *Staphylococcus aureus* isolated from a diabetic foot ulcer. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(3), 165–167.
- Diallo, K., MacLennan, J., Harrison, O. B., Msefula, C., Sow, S. O., Daugla, D. M., Johnson, E., Trotter, C., MacLennan, C. A., Parkhill, J., Borrow, R., Greenwood, B. M., & Maiden, M. C. J. (2019). Genomic characterization of novel *Neisseria* species. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50203-2>.
- Gülaydin, Ö., & Öztürk, C. (2019). Turkish Journal of Veterinary Research. *TjVR*, 3(1), 9–12.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>.
- Kengkoom, K., & Ampawong, S. (2017). *Staphylococcus sciuri* associated to subcutaneous abscess and dermatitis in ICR mouse. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 69(1), 117–122. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8563>.
- Khalil, S., ElLakany, H., & Shaaban, H. (2014). Laboratory Differentiation between *Streptococcus* Species Isolated from Different Sources. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 43(1), 37. <https://doi.org/10.5455/ajvs.167052>.
- Mama, O. M., Gómez, P., Ruiz-Ripa, L., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., & Torres, C. (2019). Antimicrobial resistance, virulence, and genetic lineages of *Staphylococcus* from horses destined for human consumption: High detection of *S. aureus* isolates of lineage ST1640 and those carrying the lukPQ gene. *Animals*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/ani9110900>.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Papadopoulos, T., Soutos, N., Martziou, E., Koulourida, V., Govaris, A., Pexara, A., Zdragas, A., & Papa, A. (2014). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. from ready-to-eat fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 59(5), 500–506. <https://doi.org/10.1111/lam.12304>.
- Sipahutar, Y. H., Masengi, S., & Wenang, V. (2017). Kajian Penerapan Good Manufacturing Practices dan Sanitation Standard Operation Procedure pada Produk Pindang Air Garam Ikan Tongkol (*Euthynnus Affinis*) dalam Upaya Meningkatkan Keamanan Pangan di Kabupaten Kendal, Jawa Tengah. *Prosiding Simposium Nasional Ikan Dan Perikanan*, 1063–1075.
- Stepanović, S., Vuković, D., Trajković, V., Samardžić, T., Čupić, M., & Švabić-Vlahović, M. (2001). Possible virulence factors of *Staphylococcus sciuri*. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00150-1).
- Tagliavia, M., Salamone, M., Bennici, C., Quatrini, P., & Cuttitta, A. (2019). A modified culture medium for improved isolation of marine vibrios. *MicrobiologyOpen*, 8(9), 1–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.835>.
- Thairu, Y., Usman, Y., & Nasir, I. (2014). Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 1(4), 168. <https://doi.org/10.4103/2384-5147.144725>.
- Vira, H., Bhat, V., & Chavan, P. (2016). Diagnostic Molecular Microbiology and its applications: Current and Future Perspectives. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1(1), 20–31. <https://doi.org/10.15761/cmids.1000105>.
- Vithanage, N. R., Yeager, T. R., Jadhav, S. R., Palombo, E. A., & Datta, N. (2014). Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.023>.
- Yeung, M., & Thorsen, T. (2016). Development of a more sensitive and specific chromogenic agar medium for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and other



vibrio species. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(117), 1–9.
<https://doi.org/10.3791/54493>